



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

Doctorado en Biociencias Moleculares

**ESTUDIOS GENÉTICOS Y FISIOPATOLÓGICOS PARA LA
BÚSQUEDA DE NUEVOS BIOMARCADORES Y TERAPIAS
EN ACIDEMIA PROPIÓNICA**

TESIS DOCTORAL

Ana Rivera Barahona

Madrid, 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular



ESTUDIOS GENÉTICOS Y FISIOPATOLÓGICOS PARA LA BÚSQUEDA DE NUEVOS BIOMARCADORES Y TERAPIAS EN ACIDEMIA PROPIÓNICA

Memoria presentada por la licenciada en Bioquímica

Ana Rivera Barahona

Para optar al grado de doctor en Biociencias Moleculares

en la modalidad de doctorado internacional

Trabajo realizado bajo la supervisión y dirección de:

Dra. Lourdes Ruiz Desviat

Profesor titular del Departamento de Biología Molecular

Universidad Autónoma de Madrid

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM). Este trabajo ha sido posible gracias a una ayuda de posgrado para contratos predoctorales para la formación de doctores 2014 (BES-2014-069420) y a una ayuda para la movilidad predoctoral para la realización de estancias breves en centros I+D 2017 (EEBB-I-18-12870).

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	5
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	9
1. Acidemia propiónica	13
1.1. Diagnóstico	15
1.2. Presentación clínica	15
1.3. Fisiopatología	16
1.4. Tratamiento	19
1.5. Terapias en investigación	20
1.5.1. Terapia génica	21
1.5.2. Tratamiento antioxidante	21
1.5.3. Terapias de reemplazo enzimático, específicas de mutación y anaplerótica	22
2. Función mitocondrial y estrés oxidativo	23
2.1. La mitocondria y el metabolismo energético	23
2.2. Especies reactivas de oxígeno y su metabolismo	24
2.3. Desarrollo de terapias basadas en la homeostasis redox	26
3. miRNAs como reguladores de la expresión génica	29
3.1. Biogénesis y mecanismo de acción de los miRNAs	29
3.2. miRNAs en estados fisiológicos y patológicos	32
3.3. miRNAs como biomarcadores y dianas terapéuticas	34
OBJETIVOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS	41
1. Materiales	43
1.1. Muestras plasmáticas de controles y de pacientes con acidemia propiónica	43
1.2. Líneas celulares	43
1.3. Modelo murino	44
1.4. Vectores	44
1.5. Reactivos y otros materiales	45
1.6. Anticuerpos	49
1.7. Oligonucleótidos	50
1.8. Soporte informático	53
2. Métodos	54
2.1. Cultivos celulares	54
2.1.1. Mantenimiento de los cultivos	54
2.1.2. Transfecciones	54

2.2. Técnicas de ácidos nucleicos	55
2.2.1. Aislamiento de ácidos nucleicos en células y tejidos	55
2.2.2. Electroforesis y cuantificación de ácidos nucleicos	55
2.2.3. Amplificación de gDNA	56
2.2.4. RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR)	56
2.2.5. Mutagénesis dirigida	57
2.2.6. Secuenciación	57
2.2.7. Genotipado de ratones <i>Pcca</i> ^{-/-} (A138T)	57
2.2.8. Determinación del contenido de DNA mitocondrial en tejidos de ratón	58
2.3. Técnicas de proteínas	58
2.3.1. Preparación de homogenados para inmunodetección	58
2.3.2. Separación electroforética de proteínas en geles SDS-PAGE, electrotransferencia e inmunodetección	59
2.3.3. Microarray de proteínas en fase reversa (RPPma)	60
2.3.4. Detección de proteínas carboniladas en tejidos de ratón	60
2.4. Ensayos enzimáticos	61
2.4.1. Actividad propionil-CoA carboxilasa	61
2.4.2. Actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial	61
2.5. Detección de daño oxidativo a lípidos	62
2.5.1. Determinación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)	62
2.5.2. Determinación de los niveles de isoprostanos	62
2.6. Determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno mitocondrial <i>in vivo</i>	63
2.7. Técnicas histológicas, microscopía óptica y confocal	63
2.7.1. Preparación de muestras histológicas	63
2.7.2. Detección de radical superóxido con la sonda dihidroetidio (DHE)	64
2.8. Tratamiento <i>in vivo</i> con MitoQ y resveratrol	64
2.9. Análisis <i>in silico</i>	65
2.10. Análisis estadístico	65
RESULTADOS	67
1. Caracterización de nuevas variantes en <i>PCCA</i> y <i>PCCB</i> causantes de acidemia propiónica	69
1.1. Análisis del efecto de variantes <i>missense</i> sobre la estructura y la actividad de PCC	69
1.2. Análisis del efecto del crecimiento de fibroblastos de pacientes en condiciones permisivas de plegamiento	76
2. Estudio <i>in vivo</i> de la función mitocondrial y de la homeostasis redox como vías que contribuyen a la fisiopatología de la acidemia propiónica	77
2.1. Evaluación de la función mitocondrial	77

2.1.1. Análisis cuantitativo de proteínas del metabolismo energético	77
2.1.2. Análisis de la actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones	80
2.1.3. Análisis del contenido de DNA mitocondrial	81
2.2. Evaluación de la homeostasis redox	81
2.2.1. Análisis de la producción de ROS: determinación de los niveles de radical superóxido y de peróxido de hidrógeno	82
2.2.2. Análisis del daño oxidativo a proteínas, lípidos y DNA	83
2.3. Evaluación de parámetros relacionados con la muerte celular	86
3. Efecto del tratamiento con MitoQ y resveratrol en el modelo murino de acidemia propiónica	89
3.1. Análisis del daño oxidativo a lípidos y DNA	89
3.2. Análisis de los niveles de enzimas antioxidantes	90
3.3. Análisis del marcador de muerte celular CYPD	93
3.4. Análisis del marcador de daño cardíaco BNP	94
4. Identificación y caracterización de miRNAs desregulados en el modelo murino de acidemia propiónica	95
4.1. Perfil hepático de miRNAs	95
4.2. Análisis de la expresión de miR-34a-5p, miR-338-3p y miR-350	98
4.3. Análisis de las potenciales dianas de miR-34a-5p	99
4.4. Análisis de la expresión de miRNAs específicos de cerebro	101
5. Identificación de miRNAs circulantes en acidemia propiónica	105
5.1. Identificación de miRNAs alterados en el plasma del modelo murino	105
5.2. Identificación de miRNAs alterados en el plasma de pacientes	106
DISCUSIÓN	113
1. Caracterización de nuevas variantes en <i>PCCA</i> y <i>PCCB</i> causantes de acidemia propiónica. Correlación genotipo-fenotipo	115
2. Papel de la disfunción mitocondrial y del estrés oxidativo en acidemia propiónica. ¿Nuevas dianas para el tratamiento de la enfermedad?	118
3. Identificación de miRNAs desregulados en acidemia propiónica: papel en la fisiopatología y potencial como nuevos biomarcadores	126
CONCLUSIONES	131
CONCLUSIONS	135
BIBLIOGRAFÍA	139
PUBLICACIONES	163

αCGDH	α-cetoglutarato deshidrogenasa
β-F1	<i>ATP synthase beta-subunit</i>
AAV	Virus adeno-asociado (<i>Adeno-associated virus</i>)
Ad	Adenovirus
Adocbl	Adenosilcobalamina
AGO	Proteína argonauta
AKT	<i>RAC-alpha serine/threonine-protein kinase</i>
AMM	Aciduria metilmalónica
AMPK	<i>5'-AMP-activated protein kinase</i>
AP	Acidemia propiónica
ARE/EpRE	<i>Antioxidant/Electrophile Response Element</i>
BC	Biotina carboxilasa
BCCP	Transportador de carboxi-biotina
BCKDH	Complejo α-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa
BCL2	<i>Apoptosis regulator Bcl-2</i>
BNP	<i>Natriuretic peptide B</i>
BT	Transferencia de biotina
CAT	Catalasa
CASP3	Caspasa-3
CORE2	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 2</i>
COXII	<i>Cytochrome c oxidase subunit 2</i>
CT	Carboxitransferasa
CTE	Cadena transportadora de electrones
CYPD	Ciclofilina D
DBT	Dihidrolipoil transacetilasa
DHE	Dihidroetidio
DLP1	<i>Dynamin-1-like protein</i>
DNPH	2, 4-dinitrofenilhidrazona
EMH	Enfermedad metabólica hereditaria
ENCODE	<i>Encyclopedia of DNA elements</i>
ERC	Enfermedad renal crónica
FOXO3	<i>Forkhead box protein O3</i>
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
HSF	<i>Human Splice Finder</i>
HSP60	<i>60 kDa heat shock protein</i>
IF1	<i>ATPase inhibitor</i>

IsoPs	Isoprostanos
JNK	<i>Mitogen-activated protein kinase 8</i>
KEAP1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
LDHA	Lactato deshidrogenasa
lncRNA	RNA no codificante largo (<i>long ncRNA</i>)
MCM	Metilmalonil-CoA mutasa
MDA	Malonildialdehído
MEK1	<i>Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>
miRNA	microRNA
MitoB	ácido MitoBorónico
mPTP	Poro de transición de permeabilidad mitocondrial
MS/MS	Espectrometría de masas
MSUD	Enfermedad de Jarabe de Arce (<i>Maple Syrup Urine Disease</i>)
mtDNA	DNA mitocondrial
ncRNA	RNA no codificante (<i>non-coding RNA</i>)
NDUFS3	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NGS	Secuenciación masiva (<i>Next Generation Sequencing</i>)
NMDA	ácido N-metil-D-aspartico
NRF1	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
OGG1	8-oxo-guanina DNA glicosilasa 1
OPA1	<i>Dynamin-like 120 kDa protein</i>
OXPHOS	Fosforilación oxidativa (<i>Oxidative phosphorylation</i>)
p38	<i>Mitogen-activated protein kinase 11</i>
PCC	Propionil-CoA carboxilasa
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PGC1α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
piRNAs	RNAs asociados a proteínas PIWI
pre-miRNA	miRNA precursor
pri-miRNA	miRNA primario
RISC	Complejo inductor del silenciamiento (<i>RNA-induced silencing complex</i>)
RPPma	Array de proteínas en fase reversa (<i>Reverse Phase Protein microarray</i>)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive oxygen species</i>)
SDHB	<i>Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit</i>
siRNA	RNAs interferentes cortos (<i>short-interfering RNA</i>)
SIRT1	<i>NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1</i>
SNC	Sistema nervioso central
snRNA	RNA nuclear pequeño (<i>small-nuclear RNA</i>)
SOD	Superóxido dismutasa
TBARS	Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico

TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (<i>TriCarboxylic Acid cycle</i>)
TEM	Transición epitelio-mesénquima
UTR	Región no traducida (<i>Untranslated region</i>)

La acidemia propiónica (AP), una de las acidemias orgánicas más frecuentes, resulta de mutaciones en los genes *PCCA* y *PCCB* que provocan la deficiencia en el enzima mitocondrial propionil-CoA carboxilasa (PCC). La AP es una enfermedad heterogénea a nivel genético que se presenta comúnmente de manera neonatal con una sintomatología diversa, siendo frecuentes las complicaciones neurológicas y cardíacas. Este amplio espectro mutacional y clínico refleja la necesidad de caracterizar las variantes causantes de AP, así como de profundizar en los mecanismos moleculares que subyacen la fisiopatología de la enfermedad.

El punto de partida de este trabajo ha sido el análisis estructural y funcional de 22 variantes de significado clínico incierto identificadas en pacientes con diagnóstico de AP. El mapeo de los cambios en el modelo de homología de la PCC humana reveló que la mayor parte desestabilizan la estructura de la proteína. Los resultados del estudio funcional en un sistema eucariota permitieron confirmar el efecto patogénico de los cambios, identificándose variantes catalíticas y estructurales. Además, se pudo recuperar ligeramente la actividad de la PCC y los niveles de proteína al crecer a 28°C fibroblastos portadores de alguno de estos cambios. Finalmente, el análisis de los datos clínicos disponibles permitió en algunos casos establecer la correlación entre el genotipo y el fenotipo de los pacientes, fundamental para predecir la progresión de la enfermedad.

Con el fin de profundizar en la fisiopatología de la AP dirigimos nuestra investigación hacia el estudio de la función mitocondrial y de la homeostasis redox. Utilizando el modelo murino de la enfermedad hemos detectado niveles alterados de proteínas asociadas al metabolismo mitocondrial, así como defectos en la actividad de los complejos OXPHOS y depleción de mtDNA en tejidos relevantes para la AP. Se ha encontrado también un incremento de ROS y de daño oxidativo, concomitante con variaciones de enzimas antioxidantes. Nuestros estudios indican que la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo juegan un papel importante en la fisiopatología de la AP. El tratamiento del modelo murino de la enfermedad con los compuestos antioxidantes MitoQ y resveratrol resultó en un efecto beneficioso, contrarrestando el daño oxidativo y los niveles del marcador de daño cardíaco BNP. Estos estudios abren la puerta a investigar en profundidad el tratamiento con compuestos antioxidantes como terapia adyuvante en AP.

Asimismo, hemos detectado miRNAs específicamente alterados en el cerebro, el corazón y el hígado del modelo murino de AP. El incremento de miR-34a-5p en estos tejidos se pudo correlacionar en algunos casos con la reducción de sus dianas BCL2 y MEK1, observación que se comprobó mediante un análisis funcional en modelos celulares. Además, se han identificado perfiles diferentes de miRNAs circulantes en el plasma de individuos control y de pacientes con AP, varios de los cuales coinciden con los que se encontraron desregulados en el modelo murino de la enfermedad. Estos resultados reflejan la utilidad de los perfiles de miRNAs para caracterizar vías alteradas que puedan contribuir a la fisiopatología de la AP, así como para identificar nuevas dianas terapéuticas y establecer nuevos biomarcadores de enfermedad.

Propionic acidemia (PA), one of the most frequent life-threatening organic acidemias, results from mutations in either *PCCA* or *PCCB* genes, thus leading to the deficiency of the mitochondrial enzyme propionyl-CoA carboxylase (PCC). PA is a heterogeneous genetic disorder usually presented as a neonatal form with a diverse symptomatology, with frequent neurological and cardiac complications. The broad mutational and clinical spectrum reflects the need of characterizing variants causing PA and to further investigate the molecular mechanisms underlying PA pathophysiology.

As a starting point in this work, we have performed a structural and functional analysis of 22 variants of uncertain clinical significance identified in patients diagnosed with PA. Mapping the changes in the homology model of the human PCC revealed most potentially disease-causing variants disturb protein structure. Functional analysis in a eukaryotic system confirmed the pathogenic effect of the missense changes, identifying catalytic and structural variants. Furthermore, we could detect a slight increase in PCC activity and protein levels in patient-derived fibroblasts carrying some of these mutations. Finally, examination of available clinical data allowed to establish genotype-phenotype correlations in some cases, which is essential for disease prognosis.

To gain deeper insight into PA pathophysiology we focused our research in the study of mitochondrial function and redox homeostasis. Using the mouse model of the disease we have detected altered levels of proteins related to mitochondrial metabolism, together with activity defects of OXPHOS complexes and mtDNA depletion in relevant tissues for PA. We have also found an increase of ROS and oxidative damage, concomitant with variations in antioxidant enzymes. Our studies point to the role of mitochondrial dysfunction and oxidative stress as key players in PA pathophysiology. Treatment of the mouse model of the disease with the antioxidant compounds MitoQ and resveratrol resulted in a beneficial effect, mainly by counteracting oxidative damage and BNP levels, a marker of cardiac damage. These studies pave the way to deeply investigate the treatment with antioxidant compounds as an adjuvant therapy for PA.

Additionally, we have detected specifically altered miRNAs in brain, heart and liver of the PA mouse model. The increase in miR-34a-5p in these tissues correlated in some cases with the reduction of its targets BCL2 and MEK1, which was further confirmed by functional analysis in different cellular models. Moreover, we have identified different signatures of circulating miRNAs in plasma samples from control and PA patients, some of which were also found deregulated in the murine model of the disease. These results reflect the potential utility of miRNA profiles to characterize altered pathways contributing to PA pathophysiology, as well as to identify new therapeutic targets and to establish new biomarkers of the disease.

INTRODUCCIÓN

1. Acidemia propiónica	13
1.1. Diagnóstico	15
1.2. Presentación clínica	15
1.3. Fisiopatología	16
1.4. Tratamiento	19
1.5. Terapias en investigación	20
1.5.1. Terapia génica	21
1.5.2. Tratamiento antioxidante	21
1.5.3. Terapias de reemplazo enzimático, específicas de mutación y anaplerótica	22
2. Función mitocondrial y estrés oxidativo	23
2.1. La mitocondria y el metabolismo energético	23
2.2. Especies reactivas de oxígeno y su metabolismo	24
2.3. Desarrollo de terapias basadas en la homeostasis redox	26
3. miRNAs como reguladores de la expresión génica	29
3.1. Biogénesis y mecanismo de acción de los miRNAs	29
3.2. miRNAs en estados fisiológicos y patológicos	32
3.3. miRNAs como biomarcadores y dianas terapéuticas	34

El término enfermedad metabólica hereditaria (EMH), también conocido como error innato del metabolismo, hace referencia a diferentes condiciones médicas causadas por defectos genéticos que provocan la desregulación de vías metabólicas que subyacen el desarrollo y la homeostasis celular.

Clásicamente el concepto de EMH englobaba defectos genéticos que afectan a un enzima, cofactor o transportador que participa en el metabolismo. Sin embargo, actualmente el término EMH se está redefiniendo al poderse abarcar en él desórdenes en los que hay una alteración de modificaciones post-traduccionales o del tráfico intracelular (Morava et al. 2015). Aunque de manera individual se consideran enfermedades raras según el criterio europeo, ya que poseen una incidencia en la población menor de 1 por cada 2000 nacimientos, en conjunto las EMH afectan a 1 de cada 1000 nacimientos (El-Hattab 2015).

Las EMH son mayoritariamente enfermedades monogénicas que generalmente se heredan de manera autosómica recesiva, aunque algunas siguen un patrón dominante o ligado al cromosoma X.

Se han descrito más de 500 EMH que pueden clasificarse desde el punto de vista fisiopatológico en:

- Patologías de intoxicación: producidas por la acumulación del sustrato previo a la vía bloqueada y de intermediarios tóxicos derivados del metabolismo alternativo de dicho compuesto. Ejemplos: aminoacidopatías (fenilcetonuria, homocistinuria, jarabe de arce, etc.) y acidemias orgánicas (acidemia propiónica, metilmalónica, glutárica, etc.).
- Patologías de déficit energético: causadas por la deficiencia del producto de la vía. Ejemplos: enfermedades mitocondriales y defectos en la oxidación de ácidos grasos.
- Patologías de almacenamiento: consecuencia de la acumulación en orgánulos celulares de metabolitos procedentes del catabolismo defectivo de moléculas complejas. Ejemplos: enfermedades lisosomales (Niemann-Pick y enfermedad de Gaucher) y peroxisomales (adrenoleucodistrofia y síndrome Zellweger).

En este trabajo nos centraremos en una de las acidemias orgánicas más frecuentes, la acidemia propiónica.

1. Acidemia propiónica

La acidemia propiónica fue inicialmente descrita en 1961 como una hiperglicinemia cetósica en un paciente que presentaba elevados niveles de glicina y cuerpos cetónicos en plasma y orina (Childs et al. 1961; Nyhan et al. 1961). En 1969 se observó que leucocitos procedentes de pacientes con la enfermedad eran incapaces de oxidar el propionato (Hsia et al. 1969). Solo un año después se identificó en hepatocitos de un paciente con hiperglicinemia cetósica el defecto en el enzima propionil-CoA carboxilasa como la causa de la deficiente oxidación del propionato (Gompertz et al. 1970). Este hallazgo se confirmó en fibroblastos de piel de individuos afectados (Hsia et al. 1971), corroborando el defecto de la propionil-CoA carboxilasa como el causante del desarrollo de la patología, que pasó a ser denominada acidemia propiónica.

La acidemia propiónica (AP, MIM #606054) es una de las acidemias orgánicas más frecuentes. Su incidencia en la población caucásica es de 1 por cada 100000 nacimientos, habiéndose reportado una incidencia superior de la enfermedad en poblaciones endogámicas de Arabia Saudí, donde alcanza uno 1 de cada 2000 a 5000 nacimientos.

La AP es una EMH de herencia autosómica recesiva causada por mutaciones en los genes *PCCA* (OMIM 232000) y *PCCB* (OMIM 232050), lo que provoca la deficiencia en el enzima propionil-CoA carboxilasa (PCC, EC 6.4.1.3). *PCCA* codifica la subunidad α de la PCC, está localizado en el cromosoma 13q32.3 y contiene 24 exones. *PCCB* codifica la subunidad β de la PCC, se encuentra en el cromosoma 3q22.3 y está constituido por 15 exones. Hasta hoy, se han descrito más de 280 variantes causantes de AP (*Human Gene Mutation Database Professional Release 2018.4*) siendo predominantes en ambos genes las mutaciones *missense* seguidas de pequeñas deleciones e inserciones y de mutaciones de *splicing*. Además, las grandes deleciones son también frecuentes en *PCCA*. Aunque se han encontrado mutaciones en homocigosis tanto en *PCCA* como en *PCCB*, los pacientes con AP son comúnmente heterocigotos, lo que complica el establecimiento de la correlación genotipo-fenotipo y la predicción de la severidad de la enfermedad.

Gracias a la publicación en 2010 de la estructura cristalizada de la PCC de *Ruegeria pomeroyi* (PDB 3n6r) (Huang et al. 2010), compuesta por subunidades α y β que comparten un 54% y un 65% de identidad de secuencia con las respectivas subunidades humanas, se pudo definir la PCC humana como un dodecámero de seis subunidades α dispuestas alrededor de un núcleo central de seis subunidades β ($\alpha_6\beta_6$) (**Figura 1A, B y C**). Las cadenas α contienen los dominios biotina carboxilasa (BC) y transportador de carboxi-biotina (BCCP), comunes a otras acil-CoA carboxilasas, y un tercero, conocido como dominio de transferencia de biotina (BT), que se ha descrito únicamente en PCC

(Wongkittichote et al. 2017). BT se localiza entre los dominios BC y BCCP y es esencial para la interacción con las subunidades β , que contienen el dominio carboxitransferasa (CT).

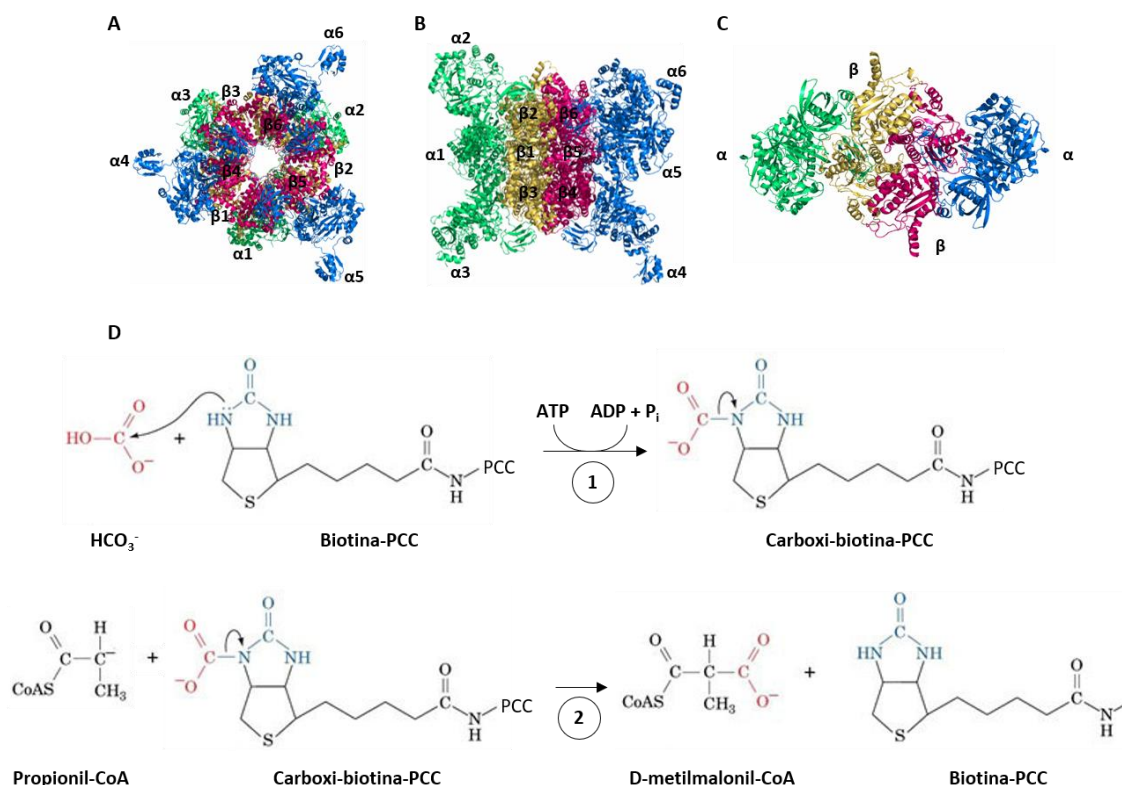


Figura 1. Estructura del holoenzima propionil-CoA carboxilasa (PCC) y mecanismo de acción. **A-B)** Distintas vistas del dodecámero de la proteína quimérica bacteriana RpPCC α -RdPCC β . **C)** Hetero-tetrámero de la holoenzima PCC humana modelado por el servicio de bioinformática del CBMSO a partir de la holoenzima de *Ruegeria pomeroyi* (código de acceso PDB 3n6r) (Huang et al. 2010), la subunidad α análoga de *S.aureus* unida al ATP (PDB 2vpq) (Mochalkin et al. 2008) y la biotina y el bicarbonato incorporados de la estructura de *E. coli* (PDB 3g8c) (Chou et al. 2009). Las subunidades α están representadas en color verde ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) y azul ($\alpha 4$, $\alpha 5$ y $\alpha 6$) y se disponen decorando la parte externa de un núcleo central hexamérico de subunidades β representadas en color amarillo ($\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$) y rosa ($\beta 4$, $\beta 5$ y $\beta 6$). **D)** Carboxilación de propionil-CoA en D-metilmalonil-CoA mediada por la PCC. La catálisis tiene lugar en dos etapas: en la primera, el dominio BC transfiere el bicarbonato a la biotina para la formación del intermediario carboxi-biotina-enzima; en la segunda, el dominio CT transfiere el carboxilo del bicarbonato al propionil-CoA para la formación de D-metilmalonil-CoA.

La PCC es un enzima mitocondrial dependiente de biotina responsable de catalizar la carboxilación del propionil-CoA en D-metilmalonil-CoA. La catálisis tiene lugar en dos etapas (**Figura 1D**). La primera es un proceso dependiente de ATP y Mg^{++} en el que el dominio BC transfiere el bicarbonato a la biotina para formar un intermediario carboxi-biotina-enzima. En la segunda etapa, el dominio CT transfiere el carboxilo del bicarbonato al segundo carbono del propionil-CoA, formándose así el D-metilmalonil-CoA, metabolito intermediario que entra al ciclo de Krebs como succinil-CoA. El propionil-CoA es un producto común a las vías de degradación de los aminoácidos valina, isoleucina, metionina y treonina, así como a los ácidos grasos de cadena impar y a la cadena lateral del colesterol. Además, bacterias del tracto intestinal, como propionobacterias, constituyen una fuente importante de producción de este metabolito.

1.1. Diagnóstico

El diagnóstico de la AP se lleva a cabo fundamentalmente a través de la detección por cromatografía de gases-espectrometría de masas de 3-hidroxipropionato (procedente de la β -oxidación del propionato), 2-metilcitrato (derivado de la conjugación de propionato con oxalacetato por la citrato sintasa) y propionilglicina en orina. Adicionalmente, la realización del perfil de acilcarnitinas por espectrometría de masas en tándem (MS/MS) en muestras de sangre en papel de individuos recién nacidos permite el diagnóstico presintomático de la enfermedad debido a la presencia de niveles elevados de propionilcarnitina (C3). La confirmación del defecto se lleva a cabo mediante la medida de la actividad enzimática PCC en linfocitos o cultivos de fibroblastos procedentes de biopsias de piel de pacientes, así como a través del análisis genético para la identificación de mutaciones en *PCCA* o *PCCB*. En situaciones en las que existe una sospecha de que el individuo posea un riesgo elevado de desarrollar la patología, como al identificarse padres portadores de mutaciones causantes de la enfermedad, se puede hacer un diagnóstico prenatal a través de la realización del estudio metabólico, enzimático y genético en muestras fetales.

1.2. Presentación clínica

La AP se presenta comúnmente de manera neonatal. Estos pacientes son asintomáticos al nacer, sin embargo, durante las primeras semanas de vida, desarrollan una sintomatología que incluye rechazo al alimento, deshidratación, vómitos, irritabilidad y letargia frecuentemente acompañada por cetonuria, hipoglicemia, hiperglicinemia, hiperamonemia y acidosis láctica. Si no se diagnostica y se trata rápidamente, los pacientes desarrollan progresivamente encefalopatía, convulsiones y coma que pueden llevar a la muerte. En un menor número de casos, la AP puede manifestarse durante la infancia o la edad adulta de los individuos. Esta forma tardía de la enfermedad se caracteriza por una sintomatología más leve y su aparición depende de la actividad enzimática residual, del consumo de precursores del propionil-CoA y de la frecuencia de aparición de factores que induzcan el catabolismo. Las complicaciones que aparecen a lo largo de la vida de los pacientes son las alteraciones neurológicas y cardíacas, responsables del elevado porcentaje de morbilidad y mortalidad, seguidas de las gastrointestinales y las inmunes (Pena et al. 2012a; Pena et al. 2012b).

La sintomatología neurológica característica de la AP incluye fundamentalmente convulsiones y desórdenes del movimiento acompañados por retraso en el desarrollo y defectos cognitivos. Algunos pacientes con AP pueden desarrollar también desórdenes psiquiátricos (Nizon et al. 2013) y del espectro autista (de la Batie et al. 2018).

El avance en las técnicas de neuroimagen, como la resonancia magnética nuclear y la tomografía por emisión de positrones, ha permitido identificar en pacientes con AP una degeneración del núcleo caudado, del putamen y del globo pálido (Johnson et al. 2009; Perez-Cerda et al. 1998). Estas estructuras forman parte de los ganglios basales, por lo que su alteración puede resultar en el desarrollo de coreoatetosis y distonía, desórdenes del movimiento característicos de pacientes con la enfermedad. Además, se ha descrito atrofia cortical, edema cerebral (Johnson et al. 2009; Pfeifer et al. 2018) y, menos frecuentemente, anomalías cerebelares (Nizon et al. 2013) y atrofia del nervio óptico (Ianchulev et al. 2003).

Las cardiomiopatías, especialmente la cardiomiopatía dilatada, es una de las complicaciones cardíacas más frecuentes en pacientes con AP. Diferentes estudios han reportado un ensanchamiento de las cámaras cardíacas y dilatación del ventrículo izquierdo (Bhan et al. 2001; Laemmle et al. 2014; Lee et al. 2009) e hipertrofia cardíaca (Mardach et al. 2005). Además, son usuales las alteraciones del ritmo cardíaco como el alargamiento del intervalo QT en el electrocardiograma (Baumgartner et al. 2007; Duras et al. 2017), lo que se ha propuesto como causa del desarrollo de arritmias. Estas complicaciones comprometen la función cardíaca siendo, de hecho, el fallo cardíaco una de las principales causas de muerte de los pacientes con AP que sobreviven a las crisis metabólicas en el periodo neonatal.

Además de las neurológicas y las cardíacas, los pacientes con AP desarrollan una serie de complicaciones menos frecuentes pero que también poseen un gran impacto en su calidad de vida. Entre ellas cabe destacar las afectaciones gastrointestinales como la pancreatitis, deficiencias en el sistema inmune (neutropenia, pancitopenia y trombocitopenia), la pérdida de audición, el fallo renal y, en el caso de mujeres, la insuficiencia ovárica prematura.

1.3. Fisiopatología

Aún hoy se desconoce con exactitud cuáles son los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de las complicaciones multiorgánicas de la AP. Se ha propuesto que uno de los factores que juega un papel relevante en la fisiopatología de la enfermedad es la aparición de una disfunción mitocondrial secundaria al defecto causada por la inhibición de la actividad de diferentes enzimas mitocondriales por el propionil-CoA y metabolitos derivados de éste. El propionil-CoA es capaz de inhibir *in vitro* la actividad de la piruvato deshidrogenasa (PDH), de la α -cetoglutarato deshidrogenasa (α CGDH) y del complejo III de la cadena transportadora de electrones (CTE) (Schwab et al. 2006); mientras que el propionato reduce la actividad de la succinil-CoA sintetasa (Brock et al. 2004). De acuerdo con estos estudios, se ha detectado una reducción de la actividad de la PDH, de la α CGDH y de los complejos de la CTE, junto con una disminución de los niveles de

proteína, en biopsias musculares de pacientes con AP (Schwab et al. 2006). Además, los tejidos cardíaco y hepático también presentan una reducción de los niveles de proteína y una deficiencia en la actividad de diferentes complejos de la CTE (de Keyser et al. 2009; Fragaki et al. 2011; Mardach et al. 2005), corroborando que la función mitocondrial está altamente comprometida en AP (**Figura 2**). Aunque la función mitocondrial no ha podido analizarse en biopsias de tejido cerebral, no sería aventurado afirmar que, dada la alta vulnerabilidad de las neuronas debido a su elevada demanda energética, la disfunción mitocondrial inducida por el efecto inhibitorio de los metabolitos tóxicos pudiese contribuir también a la sintomatología neurológica característica de la enfermedad. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que la PCC se expresa específicamente en neuronas de diferentes regiones del cerebro (Ballhausen et al. 2009) y que el propionato *in vivo* induce un aumento de daño oxidativo a lípidos y proteínas así como una reducción de enzimas antioxidantes en cerebro (MacFabe et al. 2007; Rigo et al. 2006).

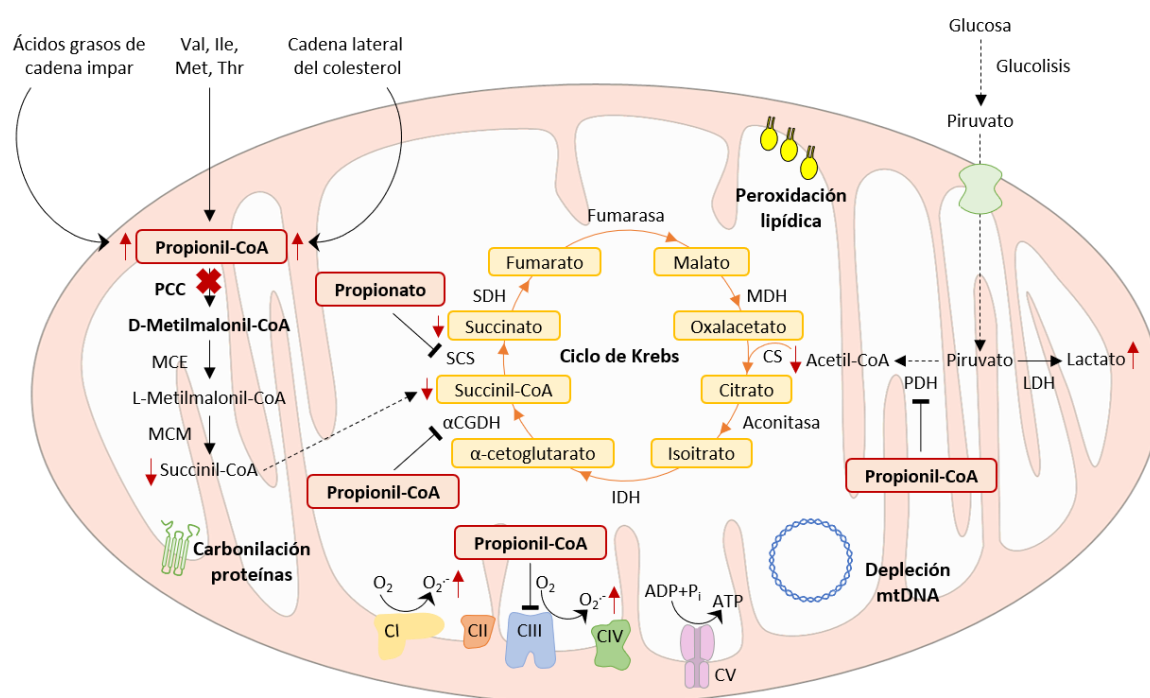


Figura 2. Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo como factores que contribuyen a la fisiopatología de la AP. La inhibición de la actividad de diferentes enzimas por parte del propionil-CoA y el propionato, acumulados como consecuencia de la deficiencia en PCC, provoca un desbalance del metabolismo energético que compromete la función mitocondrial. Como resultado, se acumulan especies reactivas de oxígeno y daño oxidativo a lípidos, proteínas y DNA mitocondrial que, en conjunto, contribuirían al desarrollo de la sintomatología de la AP. αCGDH: α-cetoglutarato deshidrogenasa; CI: NADH deshidrogenasa; CII: succinato deshidrogenasa; CIII: complejo citocromo b-c1 o ubiquinol-citocromo c reductasa; CIV: citocromo oxidasa; CV: H⁺-ATP sintasa; CS: citrato sintasa; IDH: isocitrato deshidrogenasa; LDH: lactato deshidrogenasa; MCE: metilmalonil-CoA epimerasa; MCM: metilmalonil-CoA mutasa; MDH: malato deshidrogenasa; mtDNA: DNA mitocondrial; PCC: propionil-CoA carboxilasa; PDH: piruvato deshidrogenasa; SCS: succinil-CoA sintetasa; SDH: succinato deshidrogenasa.

La disfunción mitocondrial suele asociarse a una acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*). En este sentido, se ha detectado un incremento de ROS y de marcadores de daño oxidativo a proteínas, lípidos y DNA mitocondrial (mtDNA) en muestras procedentes de pacientes con AP (Gallego-Villar et al. 2013; Mc Guire et al. 2009; Yano et al. 2003). Al igual que en otras enfermedades humanas, la alteración de la homeostasis redox puede ser uno de los mecanismos que contribuyen a la fisiopatología de la AP (**Figura 2**).

Se ha postulado que la alteración de procesos esenciales para la función neurológica y cardíaca inducida por las altas concentraciones de los metabolitos acumulados podría constituir otro factor implicado en el desarrollo de la sintomatología de la enfermedad. *In vitro* el propionato promueve una reorganización de filamentos intermedios y de actina en astrocitos del córtex que, en último término, se traduce en un cambio de la morfología celular (de Almeida et al. 2006). *In vivo*, el propionato es capaz de modificar los niveles de neurotransmisores. Se ha observado un incremento de glutamato tras la administración oral de propionato en ratas (El-Ansary et al. 2017) y de GABA debido a la inhibición de la GABA transaminasa (Morland et al. 2018), lo que resulta en la aparición de letargia (**Figura 3A**). Además, ratas sometidas a inyecciones intraventriculares de propionato desarrollan otros síntomas característicos de la AP como movimientos distónicos, epilepsia y convulsiones (MacFabe et al. 2007; MacFabe et al. 2011), pudiendo estas últimas estar mediadas por los receptores NMDA (Rigo et al. 2006). Por otro lado, el 2-metilcitrato inhibe la actividad de la glutamato deshidrogenasa (GDH) en el sentido de formación del α -cetoglutarato a partir de glutamato (Amaral et al. 2016), lo que podría explicar su acumulación (El-Ansary et al. 2017), y promueve un incremento de la concentración de amonio (Jafari et al. 2013).

Además de en el cerebro, el propionato ejerce efectos tóxicos en el corazón. Se ha visto que el propionato es capaz de reducir las corrientes eléctricas de potasio de activación lenta (I_{Ks}) y aumentar la duración del potencial de acción (DPA), lo que en último término provoca el alargamiento del intervalo QT en el electrocardiograma (Bodi et al. 2016), alteración que se ha observado en pacientes con AP (Baumgartner et al. 2007; Duras et al. 2017) (**Figura 3B**). Finalmente, el propionil-CoA inhibe el enzima N-acetilglutamato sintasa hepática (Coude et al. 1979) y el complejo responsable de la degradación de glicina (Hayasaka et al. 1982; Kolvraa 1979), contribuyendo así a la acumulación de amonio y glicina en el organismo. Estas observaciones concuerdan con la hiperamonemia e hiperglicinemia observadas en pacientes con AP (**Figura 3C**).

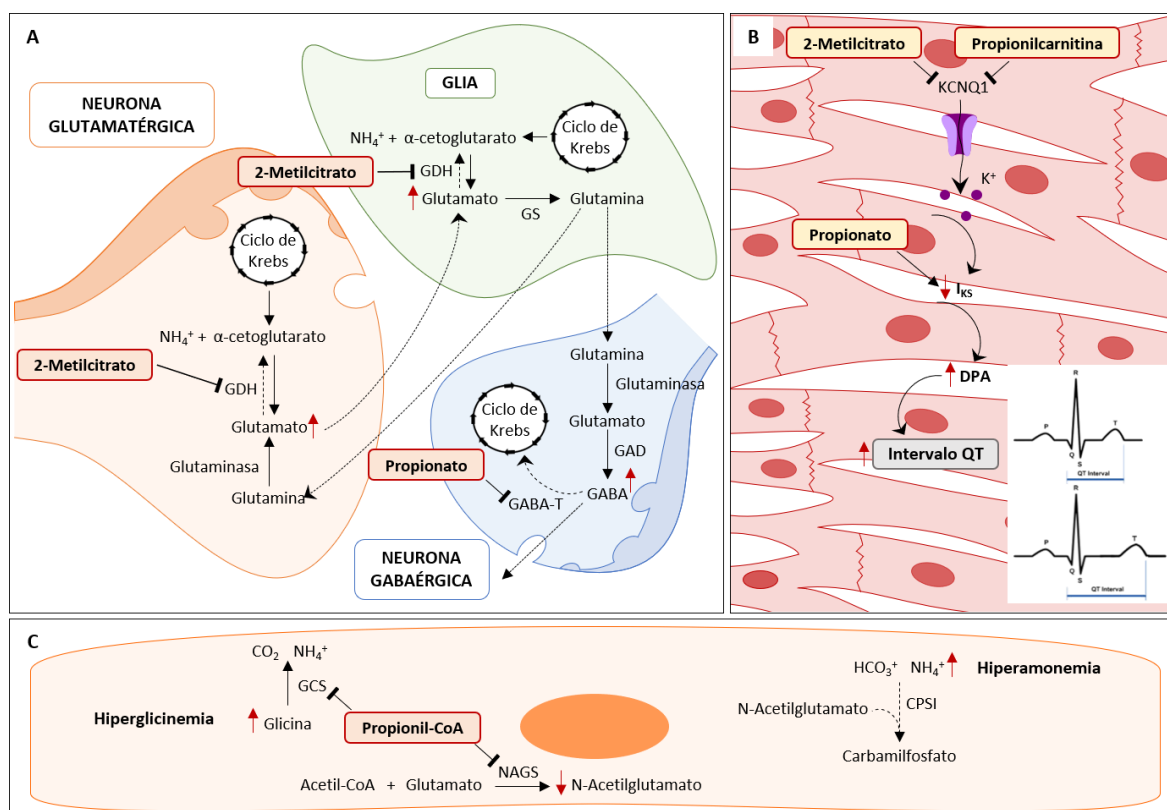


Figura 3. Mecanismos moleculares implicados en la sintomatología de la AP. A) Alteración de la transmisión sináptica como consecuencia de la acumulación de propionil-CoA y metabolitos derivados. El exceso y/o defecto de neurotransmisores (glutamato, GABA y glicina), así como la acumulación de amonio, son factores que pueden contribuir al desarrollo de las alteraciones neurológicas características de la AP (desórdenes del movimiento, epilepsia, convulsiones y letargia). B) Potencial mecanismo de aparición de arritmias en AP como consecuencia del alargamiento del intervalo QT inducido por los elevados niveles de propionato, 2-metilcitrato y propionilcarnitina. C) Aparición de hiperamonemia e hiperglicinemia por inhibición de NAGS y GCS, respectivamente, por parte del propionil-CoA. CPSI: carbamilsulfato sintasa I; GABA-T: GABA transaminasa; GAD: glutamato descarboxilasa; GCS: complejo glicina sintasa; GDH: glutamato deshidrogenasa; GS: glutamina sintasa; NAGS: N-acetilglutamato sintasa.

1.4. Tratamiento

Actualmente, no existe cura para la AP, por lo que el tratamiento de la enfermedad se basa, fundamentalmente, en una corrección metabólica que alivie la sintomatología.

En la forma neonatal de la AP o durante descompensaciones metabólicas agudas los pacientes suelen recibir un tratamiento de emergencia centrado en interrumpir el estado catabólico generado por infecciones, heridas, cirugías u otro tipo de factores estresantes que promueven el metabolismo proteico y, por tanto, la liberación de precursores del propionil-CoA que no puede ser metabolizado. Para ello, se asegura un consumo calórico elevado y se evita la toma de proteínas, se corrige la hipoglucemia y la acidosis metabólica y se tratan las infecciones con antibióticos. En ocasiones, los pacientes son sometidos a hemodiálisis o hemofiltración para una rápida eliminación de las toxinas circulantes en plasma, especialmente si hay hiperamonemia.

El tratamiento de la AP a largo plazo está fundamentalmente basado en la reducción del consumo de los precursores de propionil-CoA y en la eliminación de los metabolitos tóxicos. Así, los pacientes siguen una dieta restrictiva en proteínas, suplementada con una mezcla de aminoácidos exenta de los aminoácidos propionogénicos (valina, metionina, isoleucina y treonina), que debe asegurar un alto consumo calórico a la vez que se evitan situaciones de ayuno para prevenir el catabolismo. Además, suele prescribirse un tratamiento con el antibiótico metronidazol, para reducir las bacterias entéricas del tracto intestinal productoras de propionato, y una suplementación con L-carnitina y N-carbamilglutamato para facilitar la excreción urinaria de propionil-CoA y la eliminación del amonio, respectivamente (Roe et al. 1984; Tummolo et al. 2018).

Recientemente, se ha propuesto el trasplante hepático como una estrategia terapéutica alternativa que permite mejorar la calidad de vida de los pacientes. Fundamentalmente, el trasplante hepático reduce la frecuencia con la que se producen las descompensaciones metabólicas, por lo que la sintomatología de los pacientes mejora tras la intervención. De hecho, se ha reportado una reversión de la cardiomiopatía (Arrizza et al. 2015; Baruteau et al. 2014; Romano et al. 2010) y una mejora del pronóstico de la sintomatología neurológica (Nagao et al. 2013). Sin embargo, los pacientes trasplantados también suelen desarrollar complicaciones renales, inmunes y otras derivadas de la propia intervención que hacen que el trasplante hepático posea una elevada morbilidad y mortalidad (Charbit-Henrion et al. 2015). Cabe destacar que, a pesar de los grandes beneficios que proporciona el trasplante hepático en pacientes con AP cuando éste es exitoso, la restauración del defecto es parcial puesto que la acumulación de metabolitos tóxicos se sigue produciendo en aquellos tejidos donde normalmente la PCC también se expresa, como el cerebro y el corazón.

1.5. Terapias en investigación

En general, los tratamientos de la AP solo consiguen mejorar de manera parcial la sintomatología, principalmente porque los metabolitos tóxicos siguen acumulándose y permanecen elevados en el plasma incluso después de que el paciente sea sometido a cualquiera de las estrategias terapéuticas anteriormente expuestas. Este hecho refleja la necesidad de desarrollar nuevas terapias que reviertan de forma eficaz la patología. Actualmente, se está trabajando en implementar diferentes aproximaciones terapéuticas.

1.5.1. Terapia génica

El primer ensayo que demostró la eficacia potencial de la terapia génica para el tratamiento de la AP fue llevado a cabo en un modelo murino severo de la enfermedad: un ratón *knock-out* para *Pcca* que muere durante las primeras 24-36 horas de vida debido a la elevada cetoacidosis (Miyazaki et al. 2001). En éste, se consiguió aumentar hasta dos veces la esperanza de vida de los ratones recién nacidos tras ser inyectados intraperitonealmente con vectores adenovirales (Ad5) y adeno-asociados (AAV8) portando el cDNA de *PCCA* (Hofherr et al. 2009). Los resultados mejoraron considerablemente al realizar inyecciones intrahepáticas de AAV8 con el cDNA de *PCCA* que consiguieron rescatar aproximadamente un 60% de los ratones inyectados y que un 40% de ellos sobreviviese durante más de un mes (Chandler et al. 2011). Recientemente, la generación del modelo murino hipomorfo *Pcca*^{-/-}(A138T) (Guenzel et al. 2013), que mimetiza la sintomatología clínica y bioquímica de los pacientes con AP y sobrevive hasta la edad adulta, ha permitido establecer un modelo útil para el desarrollo de la terapia génica en AP. Se ha observado una reducción de los niveles plasmáticos de propionilcarnitina y metilcitrato tras la inyección intravenosa de vectores adenovirales (Ad5) y adeno-asociados (AAV8) con el cDNA de *PCCA* en ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) (Guenzel et al. 2013). Además, se ha conseguido corregir los niveles de ambos metabolitos cuando se ha dirigido la expresión de *PCCA* al músculo y al hígado a través del empleo de serotipos con alto tropismo muscular (AAV1) y hepático (AAV8) y con promotores específicos de tejido (Guenzel et al. 2014), demostrándose así que la corrección no solo del hígado sino también de otros tejidos es necesaria para revertir la patología.

1.5.2. Tratamiento antioxidante

Como se ha mencionado en apartados anteriores, la alteración de la homeostasis redox puede jugar un papel importante en la fisiopatología de la AP. Por este motivo, el uso de compuestos antioxidantes podría constituirse como un tratamiento adyuvante que permita mitigar la sintomatología de la enfermedad. En este sentido, recientemente se ha analizado la capacidad de diferentes antioxidantes para eliminar el exceso de ROS en líneas de fibroblastos procedentes de pacientes con AP (Gallego-Villar et al. 2014). Los compuestos MitoQ, resveratrol, tirón y trolox, disminuyeron significativamente los niveles de ROS en estas células, detectándose además cambios en la expresión de enzimas antioxidantes como MnSOD y GPx tras el tratamiento con resveratrol y tirón. Para evaluar la potencial aplicación clínica de estos compuestos para el tratamiento de la AP sería necesaria la realización de estos estudios en el modelo murino hipomorfo *Pcca*^{-/-}(A138T).

1.5.3. Terapias de reemplazo enzimático, específicas de mutación y anaplerótica

Dado que la AP está causada por la deficiencia en PCC, se ha empezado a investigar la posibilidad de utilizar la terapia de reemplazo enzimático para el tratamiento de la enfermedad. Esta estrategia se usa para restaurar la actividad de una proteína en pacientes deficientes o con una producción anormal de la misma y, de hecho, ha sido probada para tratar otras EMH, fundamentalmente enfermedades lisosomales (Desnick et al. 2012). Siendo un estudio preliminar, se ha conseguido restaurar la actividad PCC en células deficientes tras su tratamiento con las proteínas de fusión PCCA y PCCB, que portan secuencias que favorecen que éstas atraviesen las membranas plasmáticas y se dirijan a la mitocondria (Collard et al. 2018; Darvish-Damavandi et al. 2016).

Además, han comenzado a desarrollarse terapias personalizadas dirigidas a corregir el defecto genético específico. En AP las mutaciones más frecuentes son las *missense* que, generalmente, afectan al plegamiento de la proteína. Recientemente, el desarrollo de las conocidas como chaperonas farmacológicas, pequeñas moléculas que se unen a la proteína estabilizándola y facilitando su plegamiento, ha permitido aumentar *in vitro* la actividad PCC (Kelson et al. 1996). Siguiendo a las *missense*, las mutaciones de *splicing* aparecen también en un número elevado de pacientes con AP, por lo que se han desarrollado diferentes terapias para revertir este tipo de defectos. El uso de oligonucleótidos antisentido ha permitido bloquear de manera eficaz la inclusión de pseudoexones, recuperando el mRNA normal y la actividad PCC en fibroblastos procedentes de pacientes que portan mutaciones que generan sitios crípticos de *splicing* (Rincon et al. 2007). Por otro lado, se ha probado que la sobreexpresión de U1 snRNA, implicado en el procesamiento del mRNA, corrige el patrón de *splicing* normal, no así la actividad PCC, en fibroblastos de un paciente que porta un cambio que provoca la omisión del exón 13 de PCCA (Sanchez-Alcudia et al. 2011).

Una de las últimas estrategias terapéuticas que se ha incorporado a la investigación es la terapia anaplerótica. La ausencia de la PCC no solo provoca la acumulación tóxica de determinados metabolitos, sino también el déficit de sustratos anapleróticos del ciclo de Krebs como el succinil-CoA. El tratamiento con agentes anapleróticos, especialmente con citrato, ha demostrado ser una estrategia segura y potencialmente útil para el tratamiento de la enfermedad al promover un aumento de intermediarios del ciclo de Krebs y reducir el número de hospitalizaciones (Longo et al. 2017).

2. Función mitocondrial y estrés oxidativo

La mitocondria (del griego *mitos*, filamento, y *khondrion*, gránulo) es un orgánulo celular complejo que juega un papel fundamental en la fisiología celular. Inicialmente se consideraba que la única función de la mitocondria era la producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa, razón por la que aún se la conoce como la factoría energética. Sin embargo, hoy en día se sabe que la mitocondria está implicada en otra multitud de procesos esenciales para la célula como el metabolismo de ácidos grasos, pirimidinas y metales, la señalización por ROS y calcio y la muerte celular. Dadas las importantes funciones llevadas a cabo por la mitocondria, no es sorprendente que la disfunción mitocondrial haya cobrado gran relevancia en los últimos tiempos como factor contribuyente al desarrollo de diferentes enfermedades humanas como neurodegenerativas (Cabezas-Opazo et al. 2015; Exner et al. 2012), cardíacas (Hassanpour et al. 2018) y cáncer (Boland et al. 2013). Del mismo modo, y ya que el metabolismo energético puede verse comprometido, se ha sugerido una relación entre una disfunción mitocondrial secundaria al defecto y el desarrollo de la sintomatología heterogénea en diferentes EMH (Brasil et al. 2015; Fourcade et al. 2014; Wos et al. 2016).

2.1. La mitocondria y el metabolismo energético

Como se ha mencionado, la mitocondria es el motor energético celular. La producción de energía en forma de ATP requiere del acople de dos procesos fundamentales que tienen lugar en este orgánulo: el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa.

El ciclo de Krebs o de los ácidos tricarboxílicos (TCA, *TriCarboxylic Acid cycle*) es un ciclo de reacciones enzimáticas que tiene lugar en la matriz mitocondrial y que es responsable del metabolismo de moléculas, mayoritariamente en forma de acetil-CoA, procedentes de la oxidación de carbohidratos, lípidos y proteínas. Estas reacciones generan los equivalentes energéticos NADH y FADH₂ que van a ceder sus electrones a la CTE.

La CTE es un conjunto de cinco complejos multiproteicos (CI, CII, CIII, CIV y CV), localizados en las crestas de la membrana mitocondrial interna, responsables de la transferencia de electrones procedentes del NADH y del FADH₂ para la síntesis de ATP, proceso conocido como fosforilación oxidativa (OXPHOS). Brevemente, los complejos CI (NADH deshidrogenasa) y CII (succinato deshidrogenasa) transfieren los electrones del NADH y del FADH₂, respectivamente, a la ubiquinona para la formación del intermediario ubiquinol. A continuación, el complejo CIII (complejo citocromo b-c1 o ubiquinol-citocromo c reductasa) transfiere los electrones del ubiquinol al citocromo c. Finalmente, el complejo CIV (citocromo oxidasa) acopla la oxidación del citocromo c a la reducción

del O_2 para la formación de H_2O . Durante estas reacciones de oxido-reducción los complejos CI, CIII y CIV sufren cambios conformacionales que promueven el bombeo de protones al espacio intermembrana, generándose así un gradiente electroquímico que es utilizado por el complejo CV, la H^+ -ATP sintasa, para la producción de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico.

El metabolismo energético mitocondrial puede verse comprometido en determinadas situaciones. Una de las más evidentes es la presencia de defectos genéticos que afectan directamente a enzimas del TCA o de la CTE (El-Hattab et al. 2016). Además, se ha descrito que la función mitocondrial puede verse alterada no solo por la deficiencia de estas enzimas, sino también por la acumulación tóxica de metabolitos, hecho que se hace especialmente patente en las EMH. Como se ha mencionado en la sección anterior, la acumulación de propionil-CoA y de metabolitos derivados es un factor relevante en la fisiopatología de la AP debido a la inhibición que éstos ejercen sobre la actividad de diferentes enzimas mitocondriales (Brock et al. 2004; Schwab et al. 2006). Otros ejemplos de cómo el exceso de metabolitos repercute negativamente en la función mitocondrial son la acumulación de α -cetoácidos en la enfermedad de jarabe de arce (MSUD, *Maple Syrup Urine Disease*) (OMIM #248600) (Sgaravatti et al. 2003) y de metilmalonil-CoA y derivados en la aciduria metilmalónica (AMM) (OMIM #251000) (Brusque et al. 2002).

2.2. Especies reactivas de oxígeno y su metabolismo

Las ROS son un producto frecuente del metabolismo mitocondrial. De hecho, la mitocondria constituye la principal fuente de producción de ROS.

El término ROS hace referencia a un conjunto de moléculas derivadas del oxígeno que pueden clasificarse como radicales ($O_2^{\bullet-}$ y OH^{\bullet}) y no radicales (H_2O_2 y peroxinitrito) como se revisa en (Bolisetty et al. 2013). El anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) es el mayor precursor de las ROS y, al ser la más reactiva, el principal responsable de los efectos citotóxicos de las ROS en las células. En condiciones fisiológicas, los complejos CI y CIII generan pequeñas cantidades de $O_2^{\bullet-}$ a través de la transferencia de electrones a la molécula de O_2 (Larosa et al. 2018) (**Figura 4**). Tradicionalmente se ha pensado que la CTE era la principal fuente de $O_2^{\bullet-}$ en la mitocondria (Murphy 2009). Sin embargo, hoy día se conoce que los complejos multienzimáticos deshidrogenasa mitocondriales, como la α CGDH y la PDH, contribuyen también a la producción de ROS en determinadas condiciones (Adam-Vizi et al. 2013; Larosa et al. 2018). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es junto con el $O_2^{\bullet-}$ una de las ROS más frecuentes en el organismo. H_2O_2 es una especie menos dañina pero que, sin embargo, puede ser transformada en moléculas más reactivas como el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) a través de la reacción con grupos metálicos, como Fe^{2+} , en un proceso conocido como reacción de Fenton.

Ya que son producidas de manera natural en el organismo, las ROS actúan como moléculas de señalización y regulan múltiples procesos biológicos y fisiológicos como la diferenciación, la proliferación y la muerte celular, entre otros (Finkel 2011). Para asegurar que las ROS medien correctamente la señalización, la célula ha desarrollado estrictos controles de los niveles de éstas. La eliminación de ROS es llevada a cabo por las defensas antioxidantes. El término antioxidante hace referencia a un conjunto de compuestos que reaccionan de manera directa con moléculas oxidantes, como las ROS, para evitar la oxidación de una tercera molécula. Según su naturaleza, las defensas antioxidantes pueden clasificarse en enzimáticas y no enzimáticas. En el primer grupo destacan la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) (**Figura 4**). SOD es la responsable de la dismutación del $O_2^{\bullet -}$ en H_2O_2 . Se han identificado cuatro tipos de dismutasas que se diferencian según el cofactor presente en su grupo catalítico y de las que dos están presentes en células animales: MnSOD y Cu/ZnSOD (Miller 2012). Mientras que MnSOD se localiza exclusivamente en la matriz mitocondrial donde elimina el $O_2^{\bullet -}$ producido por el complejo CI (Larosa et al. 2018), Cu/ZnSOD se ha encontrado fundamentalmente en el citoplasma, pero también en el núcleo, peroxisomas y espacio intermembrana mitocondrial. Tanto la catalasa como la glutatión peroxidasa se encargan de la eliminación de H_2O_2 a través de su conversión en H_2O . La catalasa se localiza en el peroxisoma, por lo que la glutatión peroxidasa mitocondrial es la única responsable de la eliminación de todo el H_2O_2 producido en este orgánulo. Además de los enzimáticos, existen mecanismos de defensa antioxidante no enzimáticos constituidos por moléculas de bajo peso molecular entre las que se encuentra el glutatión (GSH), las vitaminas C y E y el β -caroteno, entre otros (Birben et al. 2012).

Aunque producidas de manera natural por el organismo, hay determinadas condiciones que pueden llevar a un desbalance entre la generación de ROS y la eliminación de éstas por las defensas antioxidantes. Tradicionalmente este desbalance se ha conocido como estrés oxidativo; sin embargo, en la actualidad el estrés oxidativo está definido también por el tipo de ROS generado, la célula que las produce y su localización subcelular (Schmidt et al. 2015). La disfunción mitocondrial es uno de los estados celulares que inducen una acumulación excesiva de ROS como consecuencia de la pérdida de eficiencia en la transferencia de electrones al oxígeno por parte de la CTE, aspecto que es evidente en enfermedades mitocondriales (Hayashi et al. 2015). En esta situación, ya que el estrés oxidativo excede la capacidad antioxidante de la célula, las ROS inducen daño a proteínas, lípidos y DNA a través de la modificación de su estructura y función, estableciéndose así lo que se ha denominado daño oxidativo. El estrés y el daño oxidativo activan vías de señalización que conducen a la muerte celular (Navarro-Yepes et al. 2014). De este modo, numerosos trabajos han recogido la contribución del estrés oxidativo al desarrollo de diferentes patologías humanas,

especialmente aquellas relacionadas con la edad como las enfermedades neurodegenerativas (He et al. 2015), cardíacas (Burgoyne et al. 2012), diabetes (Yang et al. 2011) y cáncer (Gill et al. 2016), pero también en EMH (Oyarzabal et al. 2016; Preissler et al. 2016; Richard et al. 2007). En AP se ha apuntado a una posible contribución de las ROS a la fisiopatología de la enfermedad (Gallego-Villar et al. 2013).

2.3. Desarrollo de terapias basadas en la homeostasis redox

En los últimos tiempos se ha realizado un gran esfuerzo en desarrollar terapias que permitan reestablecer la homeostasis redox y que, por tanto, ayuden a remitir de manera eficaz la progresión de enfermedades en las que el estrés oxidativo juega un papel relevante en su fisiopatología.

El desarrollo de estos agentes terapéuticos, que han recibido el nombre de compuestos antioxidantes, se ha basado en la naturaleza antioxidante de moléculas que se encuentran de manera natural en determinados alimentos, fundamentalmente frutas y verduras. Estos compuestos, como las vitaminas C y E y los polifenoles, no son producidos *de novo* por el organismo, sino que deben ser incorporados obligatoriamente a través de la dieta pero que, al igual que los antioxidantes endógenos, son esenciales para combatir las ROS. De hecho, varios estudios han mostrado una reducción de marcadores de estrés oxidativo tras el consumo de frutas y verduras (Hermisdorff et al. 2012; Holt et al. 2009; Thompson et al. 1999), apoyando las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud sobre el efecto beneficioso que tiene el consumo de estos alimentos.

Más allá de la ingesta de frutas y verduras, se ha tratado de demostrar el impacto que el suplemento con compuestos antioxidantes tiene en modelos *in vitro* e *in vivo* de diferentes enfermedades humanas. Mientras que *in vitro* los antioxidantes son capaces de neutralizar directamente las ROS, *in vivo* el mecanismo de acción de estos compuestos depende de su absorción, distribución, metabolismo y excreción, impidiéndose así su efecto directo (Forman et al. 2014; Schmidt et al. 2015). Actualmente, se ha confirmado que *in vivo* los antioxidantes proporcionan protección celular y tisular de manera indirecta a través de la modulación de NRF2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) y de SIRT1 (*NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1*), que promueven la expresión de las defensas antioxidantes endógenas.

NRF2 es un factor de transcripción que modula la expresión génica a través del reconocimiento de secuencias del DNA conocidas como elementos de respuesta a antioxidantes o electrófilos (ARE/EpRE, *Antioxidant/Electrophile Response Element*). La actividad transcripcional de NRF2 está regulada por diferentes mecanismos que afectan su estabilidad y su localización celular. En

condiciones fisiológicas, el inhibidor KEAP1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) se une a NRF2, promoviendo su ubiquitinación y subsecuente degradación por el proteasoma. La vida media de NRF2 está también regulada por la fosforilación mediada por la quinasa GSK3 β que genera un sitio de unión para β -TrCP (*F-box/WD repeat-containing protein 1A*), otra ubiquitin ligasa. Los compuestos antioxidantes actúan sobre esta vía a dos niveles: interaccionando con KEAP1 y activando la vía PI3K/AKT, inhibiéndose en último término la degradación de NRF2 (**Figura 4**). En estas condiciones, la vida media de NRF2 aumenta y es entonces translocado al núcleo donde, a través de su unión a los ARE, promueve la expresión de genes que participan en la defensa antioxidante (Hayes et al. 2014).

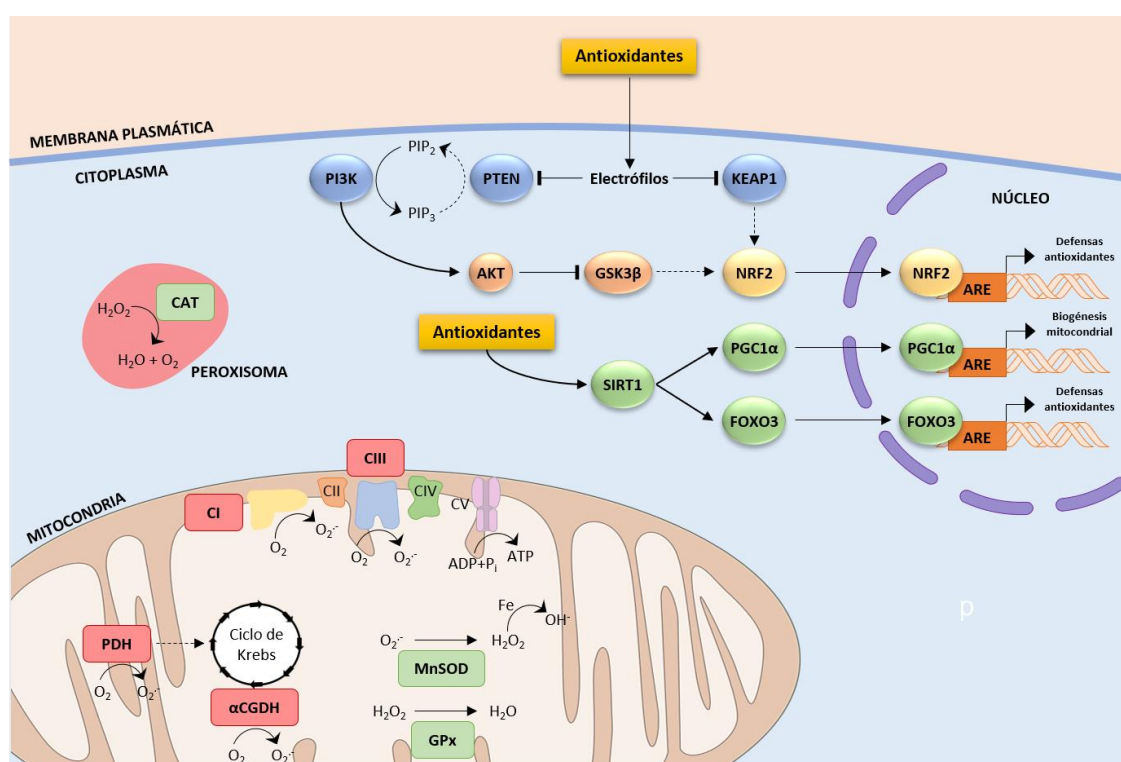


Figura 4. Metabolismo de las ROS y mecanismos de acción de los compuestos antioxidantes. Los complejos CI y CIII de la CTE y las enzimas α CGDH y PDH (recuadrados en rojo) son las principales fuentes de ROS en la mitocondria. La detoxificación de las ROS en la célula es llevada a cabo por el sistema de defensa antioxidante constituido, entre otros, por las enzimas MnSOD, CAT y GPx, (recuadrados en verde) cuya expresión está regulada por las vías de señalización de NRF2 y SIRT1. Bajo condiciones de estrés oxidativo, el tratamiento con compuestos antioxidantes contribuye a la eliminación de las ROS. *In vivo* los compuestos antioxidantes actúan sobre la vía de NRF2 y SIRT1 para promover la expresión de genes implicados en la defensa antioxidante. α CGDH: α -cetoglutarato deshidrogenasa; AKT: RAC- α serine/threonine-protein kinase; ARE: Antioxidant Response Element; CI-CV: complejos de la CTE; CAT: catalasa; FOXO3: Forkhead box protein O3; GPx: glutatión peroxidasa; GSK3 β : Glycogen synthase kinase-3 beta; KEAP1: Kelch-like ECH-associated protein 1; MnSOD: superóxido dismutasa (manganeso); NRF2: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; PDH: piruvato deshidrogenasa; PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase; PIP₂: 2-fosfoinosítidos; PIP₃: 3-fosfoinosítidos; SIRT1: NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1; PGC1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α .

La respuesta antioxidante puede estar también mediada por SIRT1. SIRT1 es una deacetilasa de clase I dependiente de NAD⁺ que regula la expresión génica a través de la modificación directa de histonas pero también de factores de transcripción como PGC1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) y FOXO3 (*Forkhead box protein O3*) (Brunet et al. 2004; Nemoto et al. 2005). La deacetilación de PGC1 α y FOXO3 aumenta su actividad transcripcional, promoviéndose así la expresión de genes implicados en la biogénesis mitocondrial y la defensa antioxidante (**Figura 4**).

Se han empleado diferentes compuestos antioxidantes en modelos murinos de EMH en los que el estrés oxidativo juega un papel importante en la fisiopatología de la enfermedad, tales como adrenoleucodistrofia (Morato et al. 2015), AMM (Pettenuzzo et al. 2003) y MSUD (Scaini et al. 2012). Además, estudios previos en el laboratorio en líneas de fibroblastos de pacientes con AP han mostrado la eficacia que el tratamiento con los antioxidantes MitoQ, resveratrol, tirón y trolox tiene en la reducción de ROS (Gallego-Villar et al. 2014). El resveratrol es un compuesto polifenólico que se encuentra de forma natural en el vino, frutos rojos y cacahuets y que ha permitido mejorar la homeostasis redox en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas (Kim et al. 2007; Mudo et al. 2012) y cardíacas (Chan et al. 2008). Por el contrario, MitoQ es un antioxidante sintético que ha sido desarrollado para tratar de solventar los problemas surgidos como consecuencia de la biodistribución de los antioxidantes. MitoQ es un catión lipofílico de trifenilfosfonio conjugado con una ubiquinona que se acumula fundamentalmente en la mitocondria (Murphy 2008) y cuyo uso ha mostrado efectos protectores en esclerosis lateral amiotrófica (Miquel et al. 2014), enfermedad de Huntington (Yin et al. 2016) y cardiomiopatía (Graham et al. 2009).

3. miRNAs como reguladores de la expresión génica

Las secuencias codificantes son las regiones más estudiadas del genoma, sin embargo, solo constituyen un 2% de éste. En los años 60 se popularizó el término de DNA basura para referirse al resto de secuencias del DNA que, al ser no codificante, se pensaba no desempeñaban ninguna función. No fue hasta 2012 cuando el proyecto ENCODE (*ENCyclopedia Of Dna Elements*) describió que hasta un 80% del genoma se transcribe en RNAs que, a pesar de no codificar proteínas, realizan funciones biológicas esenciales para los organismos (Consortium 2012). Estos RNAs recibieron el nombre de RNAs no codificantes (ncRNA, *non-coding RNA*) entre los que se encuentran el ribosómico (rRNA) y el de transferencia (tRNA), esenciales en el proceso de traducción. A partir de este momento se han descrito una gran variedad de ncRNAs que desempeñan múltiples funciones como moduladores del proceso de *splicing*, RNAs nucleares pequeños (snRNA, *small-nuclear RNA*), y reguladores de la expresión génica, entre los que destacan los ncRNAs largos (lncRNA, *long ncRNA*), los microRNAs (miRNAs), los RNAs interferentes cortos (siRNA, *short-interfering RNA*) y los RNAs asociados a proteínas PIWI (piRNAs). En este trabajo nos hemos centrado en los miRNAs, la clase de ncRNAs más ampliamente estudiada y que está cobrando gran relevancia como reguladores del transcriptoma celular.

El primer miRNA fue descrito en 1993 utilizando *Caenorabditis elegans* como modelo (Lee et al. 1993). El estudio permitió identificar un RNA, *lin-4*, que se caracterizaba por su pequeño tamaño (no más de 70 pb) y por no codificar proteína pero que, sin embargo, era capaz de regular la expresión de la proteína LIN14 a través del reconocimiento de la secuencia 3'UTR de su mRNA. Desde entonces, y en los últimos tiempos gracias al desarrollo de la tecnología de la secuenciación masiva, el número de miRNAs identificados ha crecido exponencialmente. Actualmente, hay recogidas 2654 entradas de miRNAs maduros correspondientes a la especie humana en la base de datos miRBase versión 22.1 (<http://www.mirbase.org/>).

3.1. Biogénesis y mecanismo de acción de los miRNAs

Los miRNAs se definen como RNAs de una sola cadena de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud en su forma madura que actúan como moléculas guía en el silenciamiento génico post-transcripcional. Los miRNAs se caracterizan, además, por generarse a partir de un RNA precursor en forma de horquilla y por estar altamente conservados filogenéticamente.

La biogénesis de los miRNAs es un proceso de múltiples etapas que comienza con la transcripción de un RNA precursor que va a sufrir dos procesamientos mediados por las RNasas de clase III Drosha y Dicer (**Figura 5**).

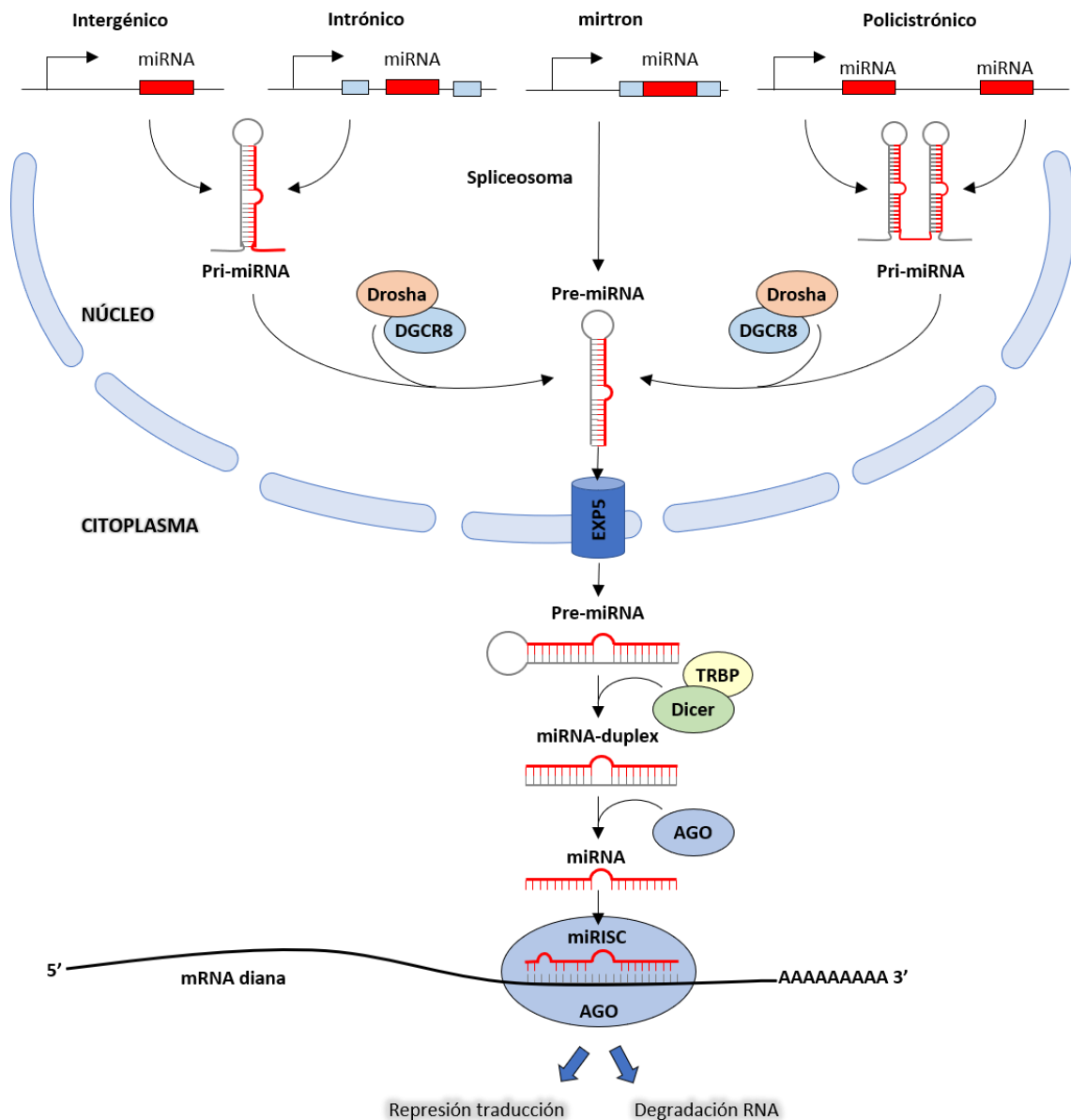


Figura 5. Biogénesis y mecanismo de acción de los miRNAs. Los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II de *locus* intergénicos, intrónicos o policistrónicos en pri-miRNAs que van a ser procesados por Drosha-DGCR8. Los *mirtrons* siguen una vía alternativa que requiere de la acción del spliceosoma para generar las características estructuras en forma de horquilla de los pre-miRNAs. Posteriormente, los pre-miRNAs son exportados al citoplasma y procesados por Dicer-TRBP para generar un miRNA dúplex. Una de las cadenas es degradada mientras que la guía es incorporada por las proteínas AGO para la formación del complejo inductor del silenciamiento (miRISC). El miRNA dirige el reconocimiento de un mRNA diana por complementariedad de bases y el complejo miRISC inhibe la expresión génica promoviendo la represión de la traducción o la degradación del mensajero. AGO: proteína argonauta; DGCR8: *DiGeorge Critical Region 8*; EXP5: exportina 5; miRISC: *miRNA- induced silencing complex*; TRBP: *TAR RNA Binding Protein*.

Los genes de los miRNAs se distribuyen a lo largo de todo el genoma, localizándose mayoritariamente en intrones, y exones en menor medida, de secuencias codificantes y no codificantes. Generalmente, la transcripción de los genes de miRNAs está mediada por la RNA polimerasa II (RNA Pol II) a partir de sus propios promotores, que comparten muchas de las características de los promotores de genes codificantes. La transcripción por RNA Pol II genera un

RNA primario (pri-miRNA) en forma de horquilla de más de 1 kb de longitud que posee 5'Cap y cola de poli-A (Kim 2005). A continuación, tiene lugar un primer procesamiento en el núcleo mediado por la RNasa III Drosha. Drosha es una proteína de unión a RNA de doble cadena que, en asociación con DGCR8 (*DiGeorge Critical Region 8*), introduce un corte en el pri-miRNA para la generación de un miRNA precursor (pre-miRNA) de unos 70 nucleótidos de longitud. Se han descrito vías alternativas independientes del procesamiento por Drosha. Este es el caso de los miRNAs localizados en intrones (*mirtrons*) en los que el pre-miRNA es generado a través del proceso de *splicing* (Sibley et al. 2012). Tras el procesamiento por Drosha, el pre-miRNA es translocado al citoplasma por la exportina 5 (EXP5) en un proceso dependiente de la hidrólisis de GTP. Ya en el citoplasma, el pre-miRNA sufre un segundo procesamiento mediado por la RNasa III Dicer junto con TRBP (*TAR RNA Binding Protein*). El corte mediado por Dicer genera un miRNA de doble cadena de aproximadamente 22 nucleótidos que se incorpora a las proteínas argonauta (AGO) para la formación del complejo inductor del silenciamiento precursor (*preRISC, precursor RNA-induced silencig complex*). En este momento tiene lugar la degradación de la cadena pasajera y la incorporación a las proteínas AGO de la cadena guía para la formación del complejo activo miRISC (*miRNA-induced silencig complex*). Aunque el proceso parece ser aleatorio, uno de los factores que contribuye a la selección de la cadena es la estabilidad del extremo 5' (Khvorova et al. 2003). Aquella cadena termodinámicamente más inestable en el extremo 5' es la seleccionada típicamente como cadena guía, proceso que está favorecido por la unión selectiva de las proteínas AGO a la cadena con base U en el primer nucleótido (Ha et al. 2014). Al mismo tiempo, la cadena pasajera es rápidamente degradada.

El complejo miRISC media la inhibición de la expresión génica a través de la represión de la traducción o la inducción de la degradación de un mRNA diana (**Figura 5**). La secuencia semilla del miRNA maduro, nucleótidos en las posiciones 2-7 del extremo 5', dirige el reconocimiento del mRNA por complementariedad de bases con la secuencia 3'UTR. Tradicionalmente se ha pensado que miRISC induce la degradación del mRNA cuando la secuencia del miRNA es totalmente complementaria al mRNA diana y promueve la inhibición de la traducción cuando la complementariedad es imperfecta. Sin embargo, en un porcentaje muy bajo la inhibición de la expresión génica por miRNAs está puramente mediada por la represión de la traducción, siendo la degradación del mRNA diana un efecto generalizado en células animales (Jonas et al. 2015). Aunque inicialmente el complejo miRISC impide la iniciación de la traducción, en último término las proteínas AGO reclutan factores para la deadenilación, la eliminación del 5'Cap y, finalmente, la degradación del mRNA.

3.2. miRNAs en estados fisiológicos y patológicos

Los miRNAs se han establecido como importantes moduladores del transcriptoma celular debido a que la mayor parte de los genes que codifican proteínas poseen varios sitios potenciales de unión a ellos. Además, un mismo miRNA puede reconocer múltiples mRNAs diana, estableciéndose así redes de miRNAs que regulan procesos biológicos esenciales para el organismo como la diferenciación, la proliferación y la muerte celular.

Las redes de miRNAs controlan procesos fundamentales para el correcto funcionamiento de la célula como la función mitocondrial y la homeostasis redox. Se han identificado miRNAs que poseen como dianas mRNAs de subunidades de la CTE (Aschrafi et al. 2008; Willers et al. 2012), de enzimas del TCA y de proteínas que participan en la biogénesis mitocondrial (Geiger et al. 2017). Además, aunque se localizan fundamentalmente en el citoplasma, algunos miRNAs se han encontrado altamente enriquecidos en la fracción mitocondrial (Bandiera et al. 2011), reflejando su potencial importancia en el control de la función de este orgánulo. La homeostasis redox puede verse también afectada por miRNAs debido al control que éstos ejercen sobre la expresión de enzimas que producen las ROS (Varga et al. 2013), así como por su efecto en la respuesta antioxidante: regulando directamente enzimas antioxidantes (Dubois-Deruy et al. 2017) o indirecto modulando los niveles de NRF2 (Cheng et al. 2013) y de SIRT1 (Yamakuchi 2012).

Cabe destacar que, además, los miRNAs desempeñan funciones específicas en cada órgano debido a su expresión exclusiva o enriquecida en un tejido particular (Sempere et al. 2004). Así, se han descrito miRNAs específicos de corazón y de cerebro, ampliamente revisado en (Wang et al. 2016b) y (Cao et al. 2016), respectivamente, que juegan un papel fundamental en su correcto funcionamiento. Concretamente, en el sistema nervioso central (SNC) los miRNAs modulan el desarrollo neuronal embrionario, la complejidad del árbol dendrítico, el crecimiento axonal y la inflamación.

Dado que los miRNAs son esenciales en el control de multitud de procesos celulares, no es sorprendente que tanto su biogénesis como su función esté altamente regulada (Ha et al. 2014). Por este motivo, la desregulación de miRNAs tiene un gran impacto en la fisiología celular y, de hecho, su alteración se ha visto contribuye al desarrollo de diferentes enfermedades humanas.

La primera muestra de que los miRNAs podían jugar un papel importante en estados patológicos procede de la obtención de perfiles de miRNAs diferentes entre tejidos normales y cancerosos (Iorio et al. 2005) que, incluso, permitían distinguir y clasificar diferentes tipos de cáncer (Lu et al. 2005). Posteriormente, y gracias a estudios de pérdida y ganancia de función, se ha determinado que los

miRNAs actúan como genes supresores de tumores u oncogenes que modulan la expresión de genes que participan en proliferación, apoptosis y angiogénesis, entre otros (Di Leva et al. 2014).

Desde este momento otros muchos estudios han mostrado la existencia de perfiles de miRNAs diferentes en múltiples enfermedades humanas, como cardíacas (Wang et al. 2016b), neurodegenerativas (Cao et al. 2016) y metabólicas (Rottiers et al. 2012). Por ejemplo, los niveles de miR-132 se han encontrado disminuidos en el hipocampo y la corteza prefrontal de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Lau et al. 2013), lo que podría promover la acumulación del péptido β -amiloide y el depósito de las placas amiloides (Hernandez-Rapp et al. 2016). De una manera semejante, la expresión de miR-34b/c está reducida en diferentes regiones del cerebro de pacientes con enfermedad de Parkinson (Minones-Moyano et al. 2011). miR-34b/c contribuye de manera directa a la patología promoviendo la acumulación de α -sinucleína (Kabaria et al. 2015) e indirecta a través de la regulación de la función mitocondrial y de la homeostasis redox (Minones-Moyano et al. 2011). Los miRNAs regulan también vías esenciales para el correcto funcionamiento del corazón como el programa de expresión de genes fetales, la vía calcineurina/factor nuclear de activación de células T (NFAT) y la vía PI3K/AKT, así como el proceso fibrótico y la apoptosis (Wang et al. 2016b), por lo que su desregulación se ha asociado al desarrollo de patologías cardíacas (Callis et al. 2009). Además de las cardíacas, la fibrosis es un proceso patológico que caracteriza multitud de enfermedades humanas asociadas al envejecimiento como la enfermedad renal crónica (ERC). Se han descrito diferentes miRNAs que a través de la modulación de la transición epitelio-mesénquima (TEM), el principal mecanismo implicado en el proceso fibrótico, contribuyen al desarrollo de la fibrosis renal y, por tanto, juegan un papel importante en la ERC (Chung et al. 2015).

El papel de los miRNAs también ha sido estudiado en el contexto de las EMH. Mersey y colaboradores llevaron a cabo el primer análisis que apuntó una posible asociación entre miR-29b y MSUD (Mersey et al. 2005). miR-29b regula la expresión de la dihidrolipoil transacetilasa (DBT), uno de los componentes del complejo α -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa (BCKDH). La disminución de los niveles de DBT por miR-29b provoca una desestabilización del complejo BCKDH y una reducción de su actividad, lo que podría explicar algunos tipos de MSUD intermitente. Posteriormente, diferentes estudios han mostrado la existencia de perfiles de miRNAs alterados en otras EMH. En linfocitos y plasma de pacientes con tirosinemia tipo I se han encontrado miRNAs desregulados que controlan la expresión de la fumarilacetoacetato hidrolasa, causante de la enfermedad (Karatas et al. 2013). En otros casos se ha apuntado que los miRNAs contribuyen a la fisiopatología de la enfermedad a través del control de vías relevantes para la misma. En Niemann Pick tipo C se han identificado miRNAs desregulados en fibroblastos de pacientes que controlan el metabolismo lipídico en los compartimentos lisosomales y en el Golgi (Ozsait et al. 2010). De

manera similar, se ha encontrado una disminución significativa de los niveles de miR-9 en el plasma de pacientes con AMM (Li et al. 2014b). Se ha propuesto que miR-9 contribuye a la fisiopatología de la enfermedad modulando la muerte neuronal a través de la acción que ejerce sobre BCL2L11, un inductor de la apoptosis (Li et al. 2014a).

Además, los miRNAs se han constituido como causa directa del desarrollo de enfermedades humanas. Se han descrito mutaciones en la secuencia de miRNAs y de la 3'UTR del mRNA que reconocen, alterándose así la función que éstos ejercen en el organismo. Mutaciones en el gen *MIR96* han sido asociadas a la sordera hereditaria (Mencia et al. 2009). Estas variantes afectan nucleótidos conservados de la secuencia semilla de miR-96, lo que impide el reconocimiento de sus dianas habituales: genes que se expresan fundamentalmente en el oído interno. Por otro lado, mutaciones en la 3'UTR de un mRNA alteran la función de los miRNAs al eliminar su sitio de unión o al generar uno nuevo para el reconocimiento de un miRNA diferente. Se ha identificado una mutación en la secuencia 3'UTR del gen *FUS* que impide la unión de miR-141/200a, produciéndose así una acumulación de FUS que está asociada al desarrollo de esclerosis lateral amiotrófica (Dini Modigliani et al. 2014). El ejemplo contrario lo encontramos en una mutación en la secuencia 3'UTR de *GFPT1* que genera un sitio de unión para miR-206*. MiR-206* disminuye los niveles de GFPT1 y causa el síndrome miasténico congénito, por lo que la transfección con antimiR-206* de mioblastos procedentes de pacientes con la mutación permite recuperar los niveles de GFPT1 (Dusl et al. 2015).

3.3. miRNAs como biomarcadores y dianas terapéuticas

La presencia de miRNAs circulantes en fluidos corporales humanos como orina, plasma, saliva y leche (Chen et al. 2012) ha permitido desarrollar una de las aplicaciones más prometedoras de los miRNAs: la de ser utilizados como biomarcadores de enfermedad.

Inicialmente se pensó que el origen de estos miRNAs circulantes radicaba en la liberación pasiva por parte de tejidos dañados, sin embargo, se ha demostrado que los miRNAs pueden ser también secretados de manera activa en estructuras vesiculares (exosomas o cuerpos apoptóticos) o asociados a proteínas (Chen et al. 2012). Los miRNAs circulantes pueden ser incorporados por células recipientes y reconocer múltiples mRNAs diana (Kosaka et al. 2010), lo que añade un grado mayor de complejidad en el control de la expresión génica.

En el plasma, la mayor parte de miRNAs identificados en individuos sanos proceden de células sanguíneas (Tonge et al. 2016), pero se han detectado también miRNAs específicos de hígado, músculo, corazón y cerebro, entre otros, (Turchinovich et al. 2012), reflejando la gran variedad de tejidos que contribuyen a los niveles de miRNAs circulantes. Diversos estudios han mostrado la

existencia de perfiles de miRNAs diferentes entre individuos sanos e individuos con alguna patología como distrofia miotónica tipo 1 (Perfetti et al. 2017), enfermedad de Parkinson (Vallelunga et al. 2014), Alzheimer (Nagaraj et al. 2017) y cardiomiopatía dilatada asociada a laminopatías (Toro et al. 2018). Además de desarrollar el uso de miRNAs como marcadores no invasivos de enfermedad para el diagnóstico, en los últimos tiempos los miRNAs plasmáticos están siendo empleados para distinguir enfermedades de similar sintomatología clínica (Sheinerman et al. 2017), para la predicción del pronóstico de la enfermedad, así como para la monitorización de la respuesta a un tratamiento específico (De Guire et al. 2013).

Otra de las aplicaciones que ha cobrado un gran auge en los últimos tiempos es el uso de miRNAs como dianas terapéuticas. Ya que la desregulación de miRNAs es una característica común de múltiples enfermedades humanas, se está llevando a cabo un gran esfuerzo para desarrollar la terapia basada en miRNAs para el tratamiento de estas patologías.

Existen dos estrategias fundamentales para modular la actividad de los miRNAs: la restauración o la inhibición de su función (van Rooij et al. 2014). La restauración de la función de un miRNA tiene como objetivo la recuperación de sus niveles en aquellos estados patológicos en los que se haya producido una disminución de éstos. La restauración de la función se lleva a cabo mediante el empleo de miRNAs de doble cadena en un vector viral o plasmídico, en los que la cadena guía posee la misma secuencia que el miRNA en cuestión mientras que la pasajera posee una serie de modificaciones que evitan su incorporación al complejo miRISC. Por otro lado, la inhibición de la función de un miRNA se utiliza para reducir su acción en estados patológicos en los que esté sobreexpresado. La inhibición se realiza utilizando oligonucleótidos antisentido modificados químicamente conocidos como antimiRs. Ambas aproximaciones han sido utilizadas en el contexto preclínico y clínico para la modulación de miRNAs en cáncer, enfermedades neurodegenerativas y cardíacas, revisado en (Rupaimoole et al. 2017; van Rooij et al. 2014).

OBJETIVOS

El **objetivo principal** de este trabajo ha sido profundizar en las bases moleculares y en los mecanismos fisiopatológicos implicados en acidemia propiónica con el fin de identificar nuevas dianas para el desarrollo de estrategias terapéuticas alternativas, así como biomarcadores de enfermedad.

De este modo, se establecieron los siguientes **objetivos específicos**:

1. Caracterización funcional de nuevas variantes identificadas en *PCCA* y *PCCB* causantes de acidemia propiónica.
2. Análisis de la función mitocondrial y de la homeostasis redox como vías que contribuyen a la fisiopatología en el modelo murino de acidemia propiónica.
3. Estudio del potencial efecto terapéutico de MitoQ y resveratrol en el modelo murino de acidemia propiónica.
4. Identificación y caracterización de miRNAs desregulados en el modelo murino y en muestras plasmáticas de pacientes con acidemia propiónica.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales	43
1.1. Muestras plasmáticas de controles y de pacientes con acidemia propiónica	43
1.2. Líneas celulares	43
1.3. Modelo murino	44
1.4. Vectores	44
1.5. Reactivos y otros materiales	45
1.6. Anticuerpos	49
1.7. Oligonucleótidos	50
1.8. Soporte informático	53
2. Métodos	54
2.1. Cultivos celulares	54
2.1.1. Mantenimiento de los cultivos	54
2.1.2. Transfecciones	54
2.2. Técnicas de ácidos nucleicos	55
2.2.1. Aislamiento de ácidos nucleicos en células y tejidos	55
2.2.2. Electroforesis y cuantificación de ácidos nucleicos	55
2.2.3. Amplificación de gDNA	56
2.2.4. RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR)	56
2.2.5. Mutagénesis dirigida	57
2.2.6. Secuenciación	57
2.2.7. Genotipado de ratones <i>Pcca</i> ^{-/-} (A138T)	57
2.2.8. Determinación del contenido de DNA mitocondrial en tejidos de ratón	58
2.3. Técnicas de proteínas	58
2.3.1. Preparación de homogenados para inmunodetección	58
2.3.2. Separación electroforética de proteínas en geles SDS-PAGE, electrotransferencia e inmunodetección	59
2.3.3. Microarray de proteínas en fase reversa (RPPma)	60
2.3.4. Detección de proteínas carboniladas en tejidos de ratón	60
2.4. Ensayos enzimáticos	61
2.4.1. Actividad propionil-CoA carboxilasa	61
2.4.2. Actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial	61
2.5. Detección de daño oxidativo a lípidos	62
2.5.1. Determinación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)	62
2.5.2. Determinación de los niveles de isoprostanos	62
2.6. Determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno mitocondrial <i>in vivo</i>	63
2.7. Técnicas histológicas, microscopía óptica y confocal	63
2.7.1. Preparación de muestras histológicas	63
2.7.2. Detección de radical superóxido con la sonda dihidroetidio (DHE)	64
2.8. Tratamiento <i>in vivo</i> con MitoQ y resveratrol	64
2.9. Análisis <i>in silico</i>	65
2.10. Análisis estadístico	65

1. Materiales

En esta sección se especifican los detalles de los materiales utilizados en este trabajo, agrupándolos según la naturaleza de éstos y no por el estudio en concreto en el que han sido empleados, que se abordará en el siguiente punto.

1.1. Muestras plasmáticas de controles y de pacientes con acidemia propiónica

En este trabajo se han utilizado muestras de plasma procedentes de individuos control y de pacientes con AP. Los pacientes fueron diagnosticados tras la realización de un estudio bioquímico y del análisis enzimático y/o genético en el Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (CEDEM, Madrid).

Las muestras de pacientes son remanentes de muestras remitidas para el diagnóstico y/o seguimiento bioquímico al CEDEM, tras la obtención del correspondiente consentimiento informado. De entre las muestras incluidas, 19 proceden de pacientes deficientes en *PCCB*, cinco en *PCCA* y cuatro de pacientes que no han sido genotipados. Los plasmas control son muestras comerciales adquiridas en Sera Lab Ltd (<http://www.seralab.co.uk>), laboratorio que las recopila de donantes anónimos.

Toda la investigación llevada a cabo con este material está autorizada por el Comité de Ética de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid, respetando los principios fundamentales de la declaración de Helsinki, del Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina y de la declaración universal de la UNESCO sobre el programa genoma humano y derechos humanos.

1.2. Líneas celulares

Los estudios de caracterización de mutaciones en *PCCA* y *PCCB* se llevaron a cabo en líneas inmortalizadas de fibroblastos de pacientes con acidemia propiónica: 5626T (deficiente en *PCCA*) y 14046T (deficiente en *PCCB*) (Clavero et al. 2002; Perez-Cerda et al. 2003).

La caracterización de mutaciones de plegamiento se realizó en líneas de fibroblastos primarios procedentes de los pacientes P6, P13 y P17 (**Tabla 8**) portadores en heterocigosis de las variantes p.R230C (*PCCA*), p.C712S (*PCCA*) y p.H250Y (*PCCB*), respectivamente.

El efecto de la sobreexpresión de miRNAs se analizó en las líneas celulares de hepatoma (Hep3B) y en una línea de fibroblastos transformados procedentes de un paciente con AP que contiene la mutación p.A138T en el gen *PCCA* (22742T).

1.3. Modelo murino

Aparte de los modelos celulares, se ha usado un modelo animal transgénico para el estudio de la fisiopatología de la AP.

Pcca^{-/-}(A138T) es un modelo murino hipomorfo de AP (Guenzel et al. 2013) que carece del gen *Pcca*, en el que un fragmento de ≈ 2 kb de la secuencia ha sido reemplazado por el de resistencia a neomicina (neo^r) vía recombinación homóloga en células embrionarias pluripotentes (Miyazaki et al. 2001), y que además contiene un transgén con el cDNA humano de *PCCA* y la mutación p.A138T, previamente caracterizada en pacientes con AP con un fenotipo moderado (Desviat et al. 2004; Ugarte et al. 1999).

Los animales se mantuvieron en condiciones asépticas (libre de patógenos), temperatura controlada y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas con encendido de luz a las 08:00 en el animalario del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO). Los ratones fueron agrupados en un máximo de 5 animales por jaula con agua y comida (Harlan Iberica) *ad libitum*. Todos los procedimientos realizados fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) del CBMSO y autorizados por la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) (PROEX22/14).

1.4. Vectores

Para los estudios de caracterización de mutaciones se han empleado los vectores pCMVA45-12 y pRcCMVB52 que portan el cDNA de *PCCA* y de *PCCB*, respectivamente, cedidos por el Dr. Leclerc y el Prof. R. A. Gravel.

1.5. Reactivos y otros materiales

Las tablas 1 a 3 recogen la información relativa a los sustratos, kits, reactivos y demás tampones y soluciones empleados en este trabajo.

Tabla 1. Reactivos

Reactivo/Producto	Referencia	Casa comercial/Origen	Uso
Acrilamida 2X	10675	Serva	Western Blot
Agarose D1 Low EEO	8010	Conda	Análisis productos PCR
Ampicilina	70232322	Roche	Cultivos bacterianos
APS (Persulfato amónico)	1201	Merck	Western Blot
Autofluorescence Eliminator Reagent	2160	Millipore	Inmunofluorescencia
Bicarbonato radiactivo (NaH*CO ₃)	NEC 086H 001mCi	Perkin Elmer	Actividad PCC
Bicarbonato sódico anhidro	6329	Merck	Actividad PCC
Blot Gel Transfer Stacks Nitrocellulose Regular	IB3010-01	Invitrogen	Western Blot
Biorad Protein Assay (Bradford)	500-006	BIORAD	Western Blot
Bisacrilamida 2X	1108970050	Merck	Western Blot
Bovine Serum Albumin, fatty acid free >96%	A6003	Sigma-Aldrich	Western Blot
n-Butanol	101990	Merck	Cuantificación MDA
Cloruro de magnesio	105679	Merck	Actividad PCC
Cloruro de potasio	4936	Merck	Actividad PCC
Complete mini EDTA free	11836170001	Roche	Western Blot
DAPI (4', 6-diamino-2-difenilindol)	168298	Merck	Marcaje DNA, IF 1/1000
DHE (Dihidroetidio)	37291	Sigma	Inmunofluorescencia
DNA Molecular Weight Marker V	10821705001	Roche	Análisis productos PCR
DNA Molecular Weight Marker φ29	-	CBMSO	Análisis productos PCR
dNTP Mix 10 mM	18427-088	Invitrogen	PCR
DTT (Ditiotreitol)	37291	Sigma-Aldrich	Western Blot Actividad PCC
ECL Western Blotting Detection	RPN 2106	GE Healthcare	Western Blot
EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético)	-	CBMSO	Cultivos celulares
FBS (Suero Fetal Bovino)	10270_106	Gibco	Cultivos celulares
Formalina	H-T501128	Sigma-Aldrich	Inmunofluorescencia
Glicerol	104093	Merck	Glicerolados

Reactivo/Producto	Referencia	Casa comercial/Origen	Uso
Glicina	500190	Merck	Western Blot
L-Glutatión reducido	G4251	Sigma-Aldrich	Actividad PCC
Glutamina	25030-081	Gibco BRL	Cultivos celulares
Hidróxido de sodio	106498	Merck	Extracción DNA
Isoflurano	880393.4	Abbvie Farmacéutica	Anestesia
Lipofectamine 2000 Transfection Reagent	11668027	Fisher Scientific	Transfección
MagNA Pure DNA Tissue Lysis Buffer	04805160001	Roche	Aislamiento DNA
MEM (Medio Esencial Mínimo)	-	CBMSO	Cultivos celulares
2-Mercaptoetanol	M3148	Sigma-Aldrich	Extracción RNA Western Blot
MitoQ	-	Prof. Michael Murphy	Antioxidante
Nitrocelulose blotting membrane 0,2 µm	10600001	GE Healthcare	Western Blot
NuPAGE LDS 4X sample buffer	NP0008	Invitrogen	Western Blot
NuPAGE MES SDS Running Buffer	NP0002	Invitrogen	Western Blot
NZYDNA Ladder 5	MB06101	NZYTECH	Análisis productos PCR
Opti-Fluor (Líquido de centelleo)	6013199	Perkin Elmer	Actividad PCC
OptiMEM I Reduced Serum Medium (1X) Liquid	31985062	Fisher Scientific	Transfección
Ponceau	32819	USB	Western Blot
Prolong gold antifade	36930	Invitrogen	Medio de montaje
n-Propionyl CoA Lithium Salt	P5397	Sigma-Aldrich	Actividad PCC
ProSieve Protein Marker	50550	Lonza	Western Blot
Resveratrol	R5010	Sigma-Aldrich	Antioxidante
SDS (Dodecil Sulfato Sódico) 10%	-	CBMSO	Western Blot
SuperSignal West FEMTO Maximum Sensitivity Substrate	34096	Fisher Scientific	Western Blot
TCA (Ácido tricloroacético)	1.00810.0250	Merck	Actividad PCC
TEMED (Tetrametiletilendiamida)	161-0801	BIORAD	Western Blot
Tripsina	-	CBMSO	Cultivos celulares
Tritón X-100	11332481001	Roche	Actividad PCC
Trypan Blue 0,4%	T8154	Sigma-Aldrich	Cultivos celulares
Tween 20 Reagent	655205	VWR	Western Blot
Wizard Plus Miniprep DNA Purification System	A1330	Promega	Aislamiento DNA plasmídico
Xileno	1.317.691.611	Panreac	Inmunofluorescencia

Tabla 2. Soluciones y tampones

Solución	Composición	Uso
NuPAGE MES SDS Running Buffer	MES 50 mM, Tris base 50 mM, SDS 0,1% EDTA 1 mM, pH 7,3	Western Blot
PBS	NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na ₂ HPO ₄ 8mM, KH ₂ PO ₄ 1,5mM	Western Blot
Tampón TAE	Tris-Acetato 40mM, EDTA 2mM	Electroforesis DNA
Tampón TBARS	PBS 1X, BHT (Butirilhidroxitolueno)	Cuantificación MDA
Tampón electrophoresis	Tris-Glicina 10X, SDS 20%	Western Blot
Tampón lisis (Células)	Tris-HCl 20mM pH 8, glutatión 0,025% (p/v)	Actividad PCC
Tampón de lisis (Células)	Tris HCl 10mM pH 7,5, NaCl 150mM, Tritón X100 0,1%, Glicerol 10%	Western Blot
Tampón de lisis (Tejidos)	Tris HCl 50mM pH 8, NaCl 100mM, DTT 1mM, Tritón X100 1%, SDS 0,1%, EDTA 0,4mM	Western Blot
Tampón transferencia	Tris-Glicina 10X	Western Blot
TBS	TrisHCl 50mM, NaCl 276mM, KCl 54mM pH 8	Western Blot
Solución de bloqueo	PBS/TBS 1X, BSA 5%	Western Blot
Solución de bloqueo	PBS 1X, BSA 0,1%	Microscopía confocal
Solución deshibridación	PBS 1X, Tween 20 0,05%, Glicina 0,2M	Western Blot
Solución de Folch	Cloroformo/Metanol 2/1 (v/v), BHT 0,005% p/v	Cuantificación isoprostanos
Solución de lavado	PBS/TBS 1X, Tween 20 0,05%	Western Blot

Tabla 3. Kits comerciales

Kit	Referencia	Casa comercial	Uso
<i>BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit</i>	4337455	Applied Biosystems	Secuenciación
ExiLENT SYBR® Green master mix	203402	Exiqon	qPCR
Fast Start Taq DNA polymerase 1000U	12032937001	Roche	PCR
High Capacity RNA-to-cDNA kit	4387406	Applied Biosystems	Retro-transcripción
MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation kit	03730972001	Roche	Aislamiento RNA
miRCURY® LNA® RT Kit	339340	Qiagen	Retro-transcripción
miRCURY® LNA® SYBR® Green PCR Kit	339345	Qiagen	qPCR
miRCURY™ RNA Isolation kit – Biofluids	300112	Exiqon	Extracción miRNAs
miRCURY™ RNA Isolation kit – Tissue	300111	Exiqon	Extracción RNA
NZY First-Strand cDNA Synthesis kit	MB12501	NZY Tech	Retro-transcripción
Oxiselect TBARS MDA quantification kit	STA-330	Cell Biolabs	Detección lipoperoxidación

Kit	Referencia	Casa comercial	Uso
OxyBlot™ Protein Oxidation Detection kit	S7150	Millipore	Detección carbonilación
PerfeCta SYBR Green Fast Mix	95072	Quanta Biosciences	qPCR
QuickChange Lightning Site-Directed mutagenesis kit	210519	Agilent Technologies	Mutagénesis
Ready-to-Use PCR Human panel I + II V3	339322 (YAHS-312Y)	Exiqon	Perfil de miRNAs
Ready-to-Use PCR Mouse & Rat panel I + II V3	339322 (YAMR-312Y)	Exiqon	Perfil de miRNAs
RNeasy mini kit	74104	Qiagen	Extracción RNA
Tunel Apoptosis detection kit	17-141	Millipore	Detección apoptosis
Universal cDNA Synthesis kit II	203301	Exiqon	Retro-transcripción
Wizard Plus Miniprep DNA purification system	A1330	Promega	Aislamiento DNA plasmídico

1.6. Anticuerpos

La siguiente tabla recoge los anticuerpos utilizados en los distintos experimentos para la detección de las proteínas indicadas en las condiciones también detalladas en la misma.

Tabla 4. Anticuerpos

Anticuerpos primarios					
Anticuerpo	Proteína/Diana	Especie, Descripción	Uso, Dilución	Referencia	Casa comercial
Anti- β -actina	β -actina	Ratón, mAb	RPPma, 1/5000	A1978	Sigma-Aldrich
Anti- β -F1-ATPasa	Sub β 1 ATPasa	Ratón, mAb	RPPma, 0,4 μ g/mL	Aldea et al. 2011	Lab J.M. Cuezva
Anti-ATPIF1 (5E2D7)	Inhibidor ATP sintasa (IF1)	Ratón, mAb	RPPma, 1/100	A21355	Invitrogen
Anti-BCL2 (50E3)	BCL2	Conejo, mAb	WB, 1/500	2870	Cell Signaling
Anti-CASP3	Caspasa 3	Conejo, pAb	WB, 1/1000	9662	Cell Signaling
Anti-CAT	Catalasa	Conejo, pAb	WB, 1/1000	ab16731	Abcam
Anti-CAT	Catalasa	Ratón, mAb	RPPma, 1/5000	c0979	Sigma-Aldrich
Anti-CYPD	Ciclofilina F	Ratón, mAb	WB, 1/1000	ab110324	Abcam
Anti-COXII	Citocromo C oxidasa (sub2)	Ratón, mAb	RPPma, 1/100	ab1102558	Abcam
Anti-COXIV	Citocromo C oxidasa (sub4)	Ratón, mAb	RPPma, 1/100	ab14744	Abcam
Anti-DLP1	DLP1	Ratón, mAb	RPPma,	14647	Cell Signaling
Anti-G6PDH	Glucosa 6P deshidrogenasa	Conejo, pAb	RPPma, 1/500	PA1-84814	Thermo Scientific
Anti-GAPDH (6C5)	Gliceraldehido 3P deshidrogenasa	Ratón, mAb	WB, 1/5000	ab8245	Abcam
Anti-GAPDH	Gliceraldehido 3P deshidrogenasa	Ratón, mAb	RPPma, 1/20000	A21355	Invitrogen
Anti-GPx1	Glutación peroxidasa 1	Conejo, pAb	WB, 1/1000	ab22604	Abcam
Anti-HSP60	HSP60	Ratón, mAb	RPPma, 0,4 μ g/mL	Aldea et al. 2011	Lab J.M. Cuezva
Anti-LDHA	Lactato deshidrogenasa	Ratón, mAb,	RPPma, 0,4 μ g/mL	Formentini et al. 2014	Lab J.M. Cuezva
Anti-MEK1 (61B12)	MAP2K1 (MEK1)	Ratón, mAb	WB, 1/500 – 1/1000	2352	Cell Signaling
Anti-MTCO2 (12C4F12)	Citocromo C oxidasa (sub2)	Ratón, mAb	RPPma, 1/100	ab110258	Abcam
Anti-NDUFS3	NADH deshidrogenasa	Ratón, mAb	RPPma, 1/100	ab10246	Abcam
Anti-OGG1	8-oxoguanina DNA glicosilasa	Conejo, pAb	WB, 1/1000	NB100-106	Novus Biologicals
Anti-OPA1	OPA1	Ratón, mAb	RPPma,	80471	Cell Signaling
Anti-PCCA	Propionil CoA carboxilasa (α)	Ratón, mAb	WB, 1/500	sc-374341	Santa Cruz Biotechnology
Anti-PCCB	Propionil CoA carboxilasa (β)	Ratón, mAb	WB, 1/500	sc-393929	Santa Cruz Biotechnology
Anti-PDHe	Piruvato deshidrogenasa	Ratón, mAb	RPPma, 1/50	9H9AF5	Invitrogen

Anticuerpo	Proteína/Diana	Especie, Descripción	Uso, Dilución	Referencia	Casa comercial
Anti-SDHB (21A11AE7)	Succinato deshidrogenasa	Ratón, mAb	RPPma, 1/500	459230	Invitrogen
Anti-SIRT1 (Sir2)	Sirtuina-1	Conejo, pAb	WB, 1/1000	07-131	Millipore
Anti-SOD2	Superóxido dismutasa (Mn)	Conejo, pAb	WB, 1/1000	ADI-SOD-110	Enzo Life Sciences
Anti-SOD2	Superóxido dismutasa (Mn)	Conejo, pAb	RPPma, 1/100	ab13533	Abcam
Anti-UQCRC2 (CORE2)	Complejo III (sub2)	Ratón, mAb	RPPma, 1/1000	MS304	Mitosciences
Anticuerpos secundarios					
Anticuerpo	Proteína/Diana	Especie, Descripción	Uso, Dilución	Referencia	Casa comercial
Anti-conejo IgG-HRP	IgG conejo	Cabra	WB, 1/5000	sc-2030	Santa Cruz Biotechnology
Anti-ratón IgG-HRP	IgG ratón	Cabra	WB, 1/10000	sc-2005	Santa Cruz Biotechnology

1.7. Oligonucleótidos

Para la amplificación de DNA, secuenciación y mutagénesis se utilizaron los siguientes oligonucleótidos.

Tabla 5. Oligonucleótidos

Genes			
Gen	Nombre	Secuencia 5' – 3'	Uso
<i>Atp5b</i>	Mus- <i>Atp5b</i> -L	AAGAGCACGGGTCGTGAG	qPCR
<i>Atp5b</i>	Mus- <i>Atp5b</i> -R	TGAGCTCTCGCTTGATATGG	qPCR
<i>Gapdh</i>	mGapdh - F	AGCTGAACGGGAAGCTCACT	qPCR
<i>Gapdh</i>	mGapdh - R	GCTTCACCACCTTCTTGATGTC	qPCR
<i>Neo</i>	Neo	TGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGC	Genotipado
<i>Nppb</i>	mNppb - F	AAGTCCTAGCCAGTCTCCAGA	qPCR
<i>Nppb</i>	mNppb - R	GAGCTGTCTCTGGGCCATTTC	qPCR
<i>Pcca</i>	EX4	AGAACTGGCATCAACATCACTGTG	Genotipado
<i>Pcca</i>	IVS2	CTAGAAAGTAAATGTTTACCAGAA	Genotipado
<i>Pcca</i>	UPS	GGCAGCAAAGATGGTCTCAGGC	Genotipado
<i>PCCA</i>	hPCCA - F	CGGATTACGCGTAGCATGGTGAGCAA	Genotipado
<i>PCCA</i>	hPCCA - R	GCCTAAACGCGTTTACTTGTACAGCT	Genotipado
<i>PCCA</i>	PCCA c.362A>G - F	GCATCCATGTTGAGGCAGCTTTTACTGGTGGGAG	Mutagénesis
<i>PCCA</i>	PCCA c.362A>G - R	CTCCCACCAGTAAAAGCTGCCTCAACATGGATGC	Mutagénesis

Gen	Nombre	Secuencia 5' – 3'	Uso
<i>PCCA</i>	PCCA c.425G>T - F	TCTGAAAGGAATCCATAAACTGGATGTACAGCTTGGG	Mutagénesis
<i>PCCA</i>	PCCA c.425G>T - R	CCCAAGCTGTACATCCAGTTTATGGATTCTTTTCAGA	Mutagénesis
<i>PCCA</i>	PCCA c.524G>A - F	TTTGCTTTCAATCTTGTCTGTCATGGCTTGAATAGCATG	Mutagénesis
<i>PCCA</i>	PCCA c.524G>A - R	CATGCTATTCAAGCCATGGACGACAAGATTGAAAGCAAA	Mutagénesis
<i>PCCA</i>	PCCA c.756T>A - F	GTAGTCTATCATCGCAAATCTAGAAGCAGCTTCTTGAG	Mutagénesis
<i>PCCA</i>	PCCA c.756T>A - R	CTCAAGAAGCTGCTTCTAGATTTGGCGATGATAGACTAC	Mutagénesis
<i>PCCA</i>	PCCA c.1195C>T - F	CAGCATAAACCCAACATTCAACTGCCAGCCG	Mutagénesis
<i>PCCA</i>	PCCA c.1195C>T - R	CGGCTGGGAGTTGAATGTTGGGTTTATGCTG	Mutagénesis
<i>PCCA</i>	PCCA c.1292T>G - F	GATGCCACTGTCCCTCGGACACCAGG	Mutagénesis
<i>PCCA</i>	PCCA c.1292T>G - R	CCTGGTGTCCGAGGGGACAGTGGCATC	Mutagénesis
<i>PCCA</i>	PCCA c.1367G>T - F	CAGTGCCTCAGTTCTATCAGAGACATATGTGATTAGTTTTGAAAT	Mutagénesis
<i>PCCA</i>	PCCA c.1367G>T - R	ATTTCAAACTAATCACATATGTCTCTGATAGAACTGAGGCACTG	Mutagénesis
<i>PCCA</i>	PCCA c.2135G>C - F	CTCCAGCTTGAGAGTGCACAGATTTACCGTG	Mutagénesis
<i>PCCA</i>	PCCA c.2135G>C - R	CACGGTGAAATCTGTGCACTCTCAAGCTGGAG	Mutagénesis
<i>PCCB</i>	PCCB c.502_504delGAA - F	GGGAGCACGGATCCAAGGAGTGGAGTCTT	Mutagénesis
<i>PCCB</i>	PCCB c.502_504delGAA - R	AAGACTCCACTCCTTGATCCGTGCTCCC	Mutagénesis
<i>PCCB</i>	PCCB c.748C>T - F	CTGACATGGTGGTGTAGTCTTGGCACCACC	Mutagénesis
<i>PCCB</i>	PCCB c.748C>T - R	GGTGGTGCCAAGACCTACACCACCATGTGAG	Mutagénesis
<i>PCCB</i>	PCCB c.814C>T - F	GGTAGTTGAAGAAATCCCAGAGATTACACAAGGCATC	Mutagénesis
<i>PCCB</i>	PCCB c.814C>T - R	GATGCCTTGTGTAATCTCTGGGATTTCTTCAACTACC	Mutagénesis
<i>PCCB</i>	PCCB c.947T>G - F	ATGATGTCCACCCTGTTGTAGGCTTTGGTTGATTCC	Mutagénesis
<i>PCCB</i>	PCCB c.947T>G - R	GGAATCAACCAAAGCCTACAACAGGGTGGACATCAT	Mutagénesis
<i>PCCB</i>	PCCB c.1066G>C - F	CTTAGGTTGGTTGCGAACAATTCCAACAGTCCTCC	Mutagénesis
<i>PCCB</i>	PCCB c.1066G>C - R	GGAGGACTGTTGGAATTGTTGCAACCAACCTAAG	Mutagénesis
<i>PCCB</i>	PCCB c.1146T>A - F	GAATATTGAATGCTTCACAGAATCTGACAAAACGAGCCC	Mutagénesis
<i>PCCB</i>	PCCB c.1146T>A - R	GGGCTCGTTTTGTCAGATTCTGTGAAGCATTCAATATTC	Mutagénesis
<i>PCCB</i>	PCCB c.1535G>A - F	ACAGCAGATTCGGGCATGTGTGGAAGAAGGTTG	Mutagénesis
<i>PCCB</i>	PCCB c.1535G>A - R	CAACCTTCTCCACACATGCCGAATCTGCTGT	Mutagénesis
<i>PCCB</i>	PCCB c.1601A>G - F	CGTCCTTGGAGAAAACGTGCAAATATTCCATTG	Mutagénesis
<i>PCCB</i>	PCCB c.1601A>G - R	CAATGGAATATTTGCACGTTTTCTCCAAGGACG	Mutagénesis
<i>PCCA</i>	APA2	GTACAGCTTGGGCCCTGGTT	Secuenciación

Gen	Nombre	Secuencia 5' – 3'	Uso
PCCA	APA3	AGCTACCTCAACATGGATGC	Secuenciación
PCCA	APA5	GAAAGGCATGCGCATTGCTT	Secuenciación
PCCA	APA7	GTAGCTCTTGCCAGAGCAGT	Secuenciación
PCCA	APA8	GCCTCAGTTCTATCAGAGCC	Secuenciación
PCCA	APA10	CCAGTTGGCTATGTCTGGTT	Secuenciación
PCCA	APA13	ACCAGACTTGCCGCAGAATT	Secuenciación
PCCB	780	AAGAATAAGTTTCTGGAGACAG	Secuenciación
PCCB	781	TACTCCCCAGCCCTAACAGACTT	Secuenciación
PCCB	783	CATGGTGGACATCATACACTCTG	Secuenciación
PCCB	cDNA2	GCTCTAGACTTGGTTTCTTTCTTTGATT	Secuenciación
12s	M-12S-L	CCTCTTAGGGTTGGTAAATTTCG	qPCR
12s	M-12S-R	CGAAGATAATTAGTTTGGGTAAATCG	qPCR

miRNAs					
miRNA	Nombre LNA	Secuencia 5' – 3'	Uso	Referencia	Casa comercial
U6	U6 snRNA		qPCR	203907	Exiqon
miR-9-5p	hsa-miR-9-5p	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	qPCR	YP00204513	Exiqon
miR-23a-3p	hsa-miR-23a-3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	qPCR	204772	Exiqon
miR-29a-5p	hsa-miR-29a-5p	ACUGAUUUUUUUGGUGUUCAG	qPCR	204430	Exiqon
miR-34a-5p	hsa-miR-34a-5p	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	qPCR	204486	Exiqon
miR-103a-3p	hsa-miR-103a-3p	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	qPCR	204063	Exiqon
miR-124-3p	hsa-miR-124-3p	UAAGGCACGCGGUGAAUGCC	qPCR	206026	Exiqon
miR-125b-5p	hsa-miR-125b-5p	UCCUGAGACCCUAACUUGUGA	qPCR	205713	Exiqon
miR-128-3p	hsa-miR-128-3p	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU	qPCR	205995	Exiqon
miR-132-3p	hsa-miR-132-3p	UACAGUCUACAGCCAUGGUCG	qPCR	206035	Exiqon
miR-138-5p	hsa-miR-138-5p	AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCG	qPCR	206078	Exiqon
miR-146a-5p	hsa-miR-146a-5p	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU	qPCR	YP00204688	Exiqon
miR-191-5p	hsa-miR-191-5p	CAACGGAAUCCCAAAAGCAGCUG	qPCR	204306	Exiqon
miR-338-3p	hsa-miR-338-3p	UCCAGCAUCAGUGAUUUUGUUG	qPCR	204719	Exiqon
miR-350	rno-miR-350	UUCACAAAGCCCAUACACUUUCAC	qPCR	205719	Exiqon
miR-423-3p	hsa-miR-423-3p	AGCUCGGUCUGAGGCCCCUCAGU	qPCR	204488	Exiqon

1.8. Soporte informático

Tabla 6. Programas y bases de datos

Programas		
Nombre	Aplicación	URL
Chromas	Análisis de secuencias nucleotídicas	http://technelysium.com.au
FIJI	Procesamiento y análisis de imágenes de microscopía	http://fiji.sc/Fiji
Human Splice Finder (HSF)	Predicción defectos de <i>splicing</i>	http://www.umd.be/HSF3/
ImageLab	Cuantificación de bandas de WB	Servicio de informática CBMSO
Mutation taster	Predicción de la patogenicidad de cambios aminoacídicos	http://www.mutationtester.org
Polyphen2	Predicción de la patogenicidad de cambios aminoacídicos	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2
Primer 3	Diseño de oligonucleótidos	http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0
Pymol	Modelado de estructuras proteicas	http://pymol.org
Quantity One (Biorad)	Cuantificación de bandas de WB	Servicio de informática CBMSO
QuickChange primer design (Agilent)	Diseño de oligonucleótidos	https://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp
SIFT	Predicción de la patogenicidad de cambios aminoacídicos	http://sift.jcvi.org
SPSS	Análisis estadístico	Servicio de informática CBMSO
Bases de datos		
Nombre	Aplicación	URL
Allen Brain Atlas	Expresión proteínas específicas de cerebro	http://www.brain-map.org/
DIANA TOOLS-miRPath	Predicción de vías reguladas por miRNAs	http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/
Ensembl	Genomas	http://ensembl.org
GeneCards	Base de datos integrativa	http://genecards.org
Human Protein Atlas	Expresión tisular de proteínas humanas	http://proteinatlas.org
Human miRNA Tissue Atlas	Expresión tisular de miRNAs	https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/tissueatlas/
miR2Disease database	Implicación de miRNAs en enfermedades humanas	http://www.mir2disease.org/
miRBase	Predicción de dianas de miRNAs	http://www.mirbase.org/
MiRTarBase	Dianas de miRNAs validadas experimentalmente	http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php
NCBI	Genomas	http://ncbi.nih.gov
TargetScan	Predicción de dianas de miRNAs	http://www.targetscan.org/vert_71/
UCSC (University of California, Santa Cruz)	Genomas	http://genome.ucsc.edu
UniProt	Proteínas	http://uniprot.org

2. Métodos

En esta sección se abordarán los métodos, organizados según la finalidad conceptual de los mismos, que se han llevado a cabo a lo largo del trabajo.

2.1. Cultivos celulares

2.1.1. Mantenimiento de los cultivos

Todas las líneas celulares, salvo que se indique lo contrario, se cultivaron en medio de cultivo MEM (*Minimal Essential Medium*) suplementado con glutamina 2 mM, suero bovino fetal (FBS) al 5% v/v (células transformadas) o al 10% v/v (fibroblastos primarios) y antibióticos en condiciones de cultivo estándar (95% de humedad relativa, 5% CO₂ y 37°C). Las líneas de fibroblastos procedentes de los pacientes P6, P13 y P17 (**Tabla 8**) se crecieron también a 28°C para los estudios de plegamiento. Para su recogida, las células se trataron con una solución de tripsina 0,25% y EDTA 0,2% tras lo que se sedimentaron por centrifugación. Las células se conservan en suero bovino fetal suplementado con DMSO al 5% congeladas en N₂ líquido.

2.1.2. Transfecciones

Para el análisis funcional de las variantes en *PCCA* y *PCCB*, las líneas 5626T y 14046T se plaquearon el día de antes de la transfección en placas de 6 pocillos (4·10⁵ células por pocillo). La transfección se llevó a cabo con lipofectamina 2000 siguiendo las instrucciones del fabricante y co-transfectando 2 ug de la construcción mutante *PCCA* o *PCCB* y 2 ug del correspondiente vector *wild-type* *PCCB* o *PCCA* para alcanzar la máxima expresión. Las células se recogieron 72 horas después de la transfección.

Para el análisis funcional de miR-34a-5p, las líneas Hep3B y 22742T se plaquearon el día de antes de la transfección en placas de 6 pocillos (2·10⁵ células por pocillo). La transfección del miR-34a-5p mimic (25 nM) y del inhibidor (50 nM) se realizó utilizando lipofectamina 2000 siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se recogieron 72 horas después de la transfección.

2.2. Técnicas de ácidos nucleicos

2.2.1. Aislamiento de ácidos nucleicos en células y tejidos

El aislamiento de ácidos nucleicos de las distintas muestras utilizadas en este trabajo se realizó siguiendo el protocolo y las recomendaciones indicadas por los proveedores de cada uno de los kits de aislamiento empleados. Las muestras se prepararon tal y como se detalla a continuación: las células en cultivo se tripsinizaron, resuspendieron con MEM o PBS y centrifugaron durante cinco minutos a 16000 g, obteniéndose así un precipitado homogéneo. Para la extracción a partir de tejidos, los animales se sacrificaron en una cámara con CO₂, tras lo que corazón, hígado, músculo y cerebro, así como distintas regiones de éste (estriado, corteza, hipocampo y cerebelo), se extrajeron e inmediatamente congelaron en nitrógeno líquido para su posterior homogenización con un homogenizador *Qiagen TissueLyser II* o *IKA ultraturrax*.

Los distintos métodos para la extracción de ácidos nucleicos que se han utilizado a lo largo del trabajo, así como las muestras de partida, se han recogido en la siguiente tabla:

Tabla 7. Métodos de aislamiento de ácidos nucleicos

Muestra de partida	Tipo de ácido nucleico	Método de aislamiento	Uso
Cola de ratón	gDNA	NaOH 50 mM a 95°C y Tris-HCl 1 M pH 8	Genotipado
Tejidos de ratón	gDNA	MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit	qPCR
Tejidos de ratón	RNA	RNeasy mini kit	qRT-PCR
Líneas celulares	miRNA	miRCURY™ RNA Isolation kit – Tissue	qRT-PCR
Tejidos de ratón	miRNA	miRCURY™ RNA Isolation kit – Tissue	qRT-PCR
Plasma de ratón	miRNA	miRCURY™ RNA Isolation kit – Biofluids	qRT-PCR
Plasma de pacientes	miRNA	miRCURY™ RNA Isolation kit – Biofluids	qRT-PCR
Cultivo bacteriano	DNA plasmídico	Wizard Plus Miniprep DNA purification	Expresión de mutaciones

2.2.2. Electroforesis y cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación y pureza de ácidos nucleicos se analizó en un Nanodrop ND-1000 (Termo Scientific), teniendo en cuenta la relación A260/280 y A260/230. El análisis de los fragmentos de cDNA, DNA plasmídico y gDNA se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa en cubetas de desarrollo horizontal acopladas a una fuente con tampón de electroforesis TAE (**Tabla 2**). Tras la electroforesis, el tamaño de las bandas se analizó por comparación de las bandas

obtenidas con distintos marcadores de peso molecular conocido (*DNA Molecular Weight Marker V* y $\phi 29$) con un transiluminador acoplado a una cámara.

2.2.3. Amplificación de gDNA

Para la amplificación del gDNA se siguió un protocolo de PCR estándar ajustándolo en cada caso según la longitud del amplicón y la temperatura de *melting* (T_m) de los oligonucleótidos (**Tabla 5**). Se amplificaron entre 250-500 ng de gDNA utilizando la polimerasa *FastStart Taq DNA polymerase* en un termociclador Veriti (Applied Biosystems). Tras la amplificación, los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa de un porcentaje determinado según el tamaño esperado con bromuro de etidio al 4% (v/v).

2.2.4. RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR)

Para la realización de la qRT-PCR, el cDNA se obtuvo por retrotranscripción del RNA total utilizando el kit *NZY First-Strand cDNA Synthesis* y oligodT (genes) o *Universal cDNA Synthesis kit II* y *miRCURY[®] LNA[®] Kit* (miRNAs) siguiendo las recomendaciones del proveedor. A continuación, el cDNA se amplificó mediante PCR con oligonucleótidos específicos (**Tabla 5**) y los kits *PerfeCta SYBR Green Fast Mix* (genes) o *ExiLENT SYBR[®] Green master mix* y *miRCURY[®] LNA[®] SYBR[®] Green PCR Kit* (miRNAs). La amplificación y el análisis se realizó en un equipo *LightCycler 480* (Roche) y los datos fueron normalizados utilizando el gen de expresión constitutiva *Gapdh*, U6 snRNA y miR-423-3p (tejidos) o miR-23a-3p (plasma). Los resultados se expresan como el parámetro *Relative Quantity* (RQ), que nos permite comparar la cantidad de mRNA en los distintos extractos, aplicando para ello el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Los perfiles de miRNAs se realizaron a partir del cDNA, obtenido como se ha descrito anteriormente, de muestras procedentes del hígado de ratones *wild-type* y *Pcca^{-/-}* (A138T) o de plasma de individuos distribuidas previamente en dos grupos de controles y dos de pacientes con AP. Se utilizó el panel *Ready-to-Use PCR Mouse & Rat o Human panel I + II V3* que contiene oligonucleótidos prealicuoteados en placas de 384 pocillos para la detección de 752 miRNAs de ratón y rata o humanos, respectivamente. La amplificación por qPCR se llevó a cabo con el kit *ExiLENT SYBR[®] Green master mix* en un instrumento ABI7900HT (Applied Biosystems) en la unidad de genómica del Parque Científico de Madrid (Madrid, España). Los datos C_t de cada miRNA se obtuvieron con el *software* ABI, considerándose negativos aquellos superiores a 37, y se analizaron con el *software* StatMiner 4.2.8. La cantidad relativa de cada miRNA se calculó usando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ y los datos se normalizaron con U6 snRNA, RNU1A, RNU5G, miR-103-3p, miR-191-5p,

miR-423-3p y Let-7c-5p para los análisis en el hígado de los ratones y con miR-Let7a, miR-103a-3p, miR-15-5p y miR-191-5p para las muestras plasmáticas humanas.

2.2.5. Mutagénesis dirigida

Para obtener las diferentes variantes alélicas del gen *PCCA* (c.317C>A, c.362A>G, c.425G>T, c.524G>A, c.688C>T, c.756T>A, c.1195C>T, c.1292T>G, c.1367G>T, c.1409T>G y c.2135G>C) y de *PCCB* (c.173A>C, c.503_505del, c.563G>C, c.748C>T, c.814C>T, c.947T>G, c.1066G>C, c.1146T>A, c.1379T>C, c.1535G>A y c.1601A>G) se partió de los plásmidos *wild-type* pCMVA45-12 y pRcCMVB52 que codifican para los respectivos cDNAs. La mutagénesis se llevó a cabo mediante PCR con el kit *QuickChange Lightning Site-Directed mutagenesis* siguiendo las recomendaciones del proveedor y empleando oligonucleótidos específicos que incorporan el cambio que a introducir (Tabla 5).

2.2.6. Secuenciación

El DNA plasmídico (300-500 ng) se secuenció mediante el método enzimático de terminación de cadena de DNA por incorporación de dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs) (Sanger et al. 1977). Para ello se utilizaron oligonucleótidos específicos (Tabla 5) a una concentración de 5 µM. Las muestras fueron enviadas para su secuenciación por Macrogen.

2.2.7. Genotipado de ratones *Pcca*^{-/-} (A138T)

Para la determinación del genotipo de los ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) se parte de una pequeña porción de cola cortada con un cauterizador. El fragmento de tejido se digiere en NaOH 50 mM a 95°C durante al menos 30 min con rondas de agitación cada 10 min. Posteriormente, la digestión es neutralizada añadiendo un décimo del volumen total de Tris-HCl 1M pH 8 y la muestra centrifugada a 18000 g durante 10 min para separar los restos no digeridos. Para la subsecuente PCR se utilizaron 250-500 ng de gDNA, presente en el sobrenadante, y los oligonucleótidos específicos indicados en la tabla 5. La pareja de oligos IVS2/Ex4 hibridan en el intrón 2 y el exón 4 del gen *Pcca*, respectivamente, y generan un fragmento de 340 pb para la detección del alelo endógeno *Pcca* (alelo +). Por otro lado, la pareja de oligos UPS/*neo* hibridan en una región aguas arriba (*upstream*) de los exones del gen *Pcca* eliminado y en el gen de resistencia a neomicina introducido, respectivamente, y generan un fragmento de aproximadamente 900 pb que permite detectar el alelo *Pcca* eliminado (alelo -).

2.2.8. Determinación del contenido de DNA mitocondrial en tejidos de ratón

La extracción del gDNA de los diferentes tejidos, así como su cuantificación y determinación de la pureza, se llevó a cabo tal y como se ha descrito anteriormente en los apartados 2.2.1. y 2.2.2., respectivamente. El diseño de los oligonucleótidos se realizó con el programa ProbeFinder (versión 2.50 para ratón). Las qPCRs fueron llevadas a cabo por el servicio de genómica del CBMSO.

Por cada reacción (10 µl de volumen final) se disponen 5 ng de gDNA de muestra (excepto en el control NTC, *No Template Control*), 3,9 µl de H₂O, 1 µl de cada par de oligonucleótidos específicos a 5 µM (**Tabla 5**) y 5 µl de *master mix SsoFast EvaGreen SuperMix* por cada uno de los genes analizados. Los datos se estandarizaron utilizando varios genes normalizadores de expresión constitutiva (18S y ARBP). El procesamiento de los datos y análisis estadístico se realizó con el software GenEx 5.3.7. mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2.3. Técnicas de proteínas

2.3.1. Preparación de homogenados para inmunodetección

Los animales se sacrificaron en una cámara con CO₂, tras lo que el cerebro, el corazón y el hígado se extrajeron e inmediatamente congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C. Aproximadamente 50 mg de tejido se homogenizan con 200-500 µl de tampón de lisis (**Tabla 2**) e inhibidor de proteasas *Complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail* a 4°C. Para ello se utiliza un homogenizador *Qiagen TissueLyser II* (dos rondas de agitación a 20 Hz de 90 segundos de duración cada una) o *IKA ultraturrax* (10 pases de 10 segundos cada uno). A continuación, los lisados se centrifugan a 4°C y 16000 g durante 30 min, guardándose los sobrenadantes a -80°C hasta su utilización.

Las células en cultivo se tripsinizaron, resuspendieron con MEM y precipitaron mediante una centrifugación de cinco minutos a 16000 g. Se obtiene así un precipitado homogéneo que se resuspende en 50 µl de tampón de lisis (**Tabla 2**) e inhibidor de proteasas (indicado anteriormente). A continuación, se realizaron tres ciclos de congelación-descongelación en N₂ líquido y 37°C para la ruptura de las células. Los lisados se centrifugaron a 4°C y 16000 g durante 10 min, guardándose los sobrenadantes a -80°C hasta su utilización.

2.3.2. Separación electroforética de proteínas en geles SDS-PAGE, electrotransferencia e inmunodetección

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo mediante la técnica de Bradford. Por muestra se prepararon 20-50 µg de proteína junto con 1 µl de DTT 1 mM y el volumen correspondiente de tampón de carga *NuPAGE LDS Sample Buffer 4X*. A continuación, las muestras se hierven durante cinco minutos para la completa desnaturalización de las proteínas.

La separación electroforética se realizó en geles *Precast* (10 o 12% según el tamaño de la proteína a analizar) de Biorad y utilizando el tampón de electroforesis (**Tabla 2**). Para determinar los pesos moleculares de las proteínas se empleó como marcador de peso molecular *ProSieve™ Color Protein Markers* (Lonza) o *Novex Sharp Pre-Stained protein Standard* (Invitrogen). Los geles se corrieron a un voltaje constante de 120V durante el tiempo necesario para separar las bandas del peso molecular esperado.

Tras la electroforesis, los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm con el equipo *Mini Protean III* durante una hora a 100V o con el sistema *iBlot Gel Transfer Stacks Nitrocellulose Regular* durante siete minutos a 20V. La eficiencia de la transferencia se comprobó mediante la tinción de las membranas con el reactivo Rojo Ponceau. A continuación, las membranas se bloquearon con leche al 5% en TBS-Tween 0,05% en agitación durante al menos dos horas y se incubaron con el anticuerpo primario diluido a las concentraciones establecidas (**Tabla 4**) en solución de bloqueo a 4°C y agitación durante toda la noche. Tras ello, las membranas se lavaron tres veces con TBS-Tween 0,05% durante 10 min y posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa (HRP) durante una hora en agitación. Pasada la incubación con el anticuerpo secundario, se realizaron tres nuevos lavados con TBS-Tween 0,05% durante 10 min y se procedió a la detección de proteínas por quimioluminiscencia utilizando ECL o FEMTO, según correspondiese, y películas de rayos X RP2 PLUS.

Para la realización de más de una detección, las membranas se incubaron tras la inmunodetección con tampón de deshibridación (**Tabla 2**) durante 20 min a 80°C, volviendo posteriormente a bloquear y seguir con el protocolo descrito anteriormente.

Las películas se escanearon y densitometraron utilizando los escáneres de BioRad G-8000 o GS-900 y los soportes informáticos *Quantity One* o *Image Lab*, respectivamente.

2.3.3. Microarray de proteínas en fase reversa (RPPma)

De nuevo, para la extracción de las proteínas a partir de tejidos se siguió el protocolo descrito en el apartado 2.3.1. de esta sección y la cuantificación proteica se llevó a cabo mediante el método de Bradford. A continuación, las muestras se diluyeron en PBS a una concentración de 0,75 mg/ml. La impresión, el procesamiento y el revelado de las muestras en el array fue realizado por el grupo de J. M. Cuezva (CBMSO, Madrid) siguiendo el protocolo descrito en (Aldea et al. 2011) y utilizando *BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer Printer* equipado con una punta sólida (MCP310S) a humedad y temperatura constantes. Cada muestra se imprimió por duplicado y los arrays se incubaron a 4°C con anticuerpos primarios monoclonales altamente específicos (**Tabla 4**) y el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con Alexa-488. Para asegurar la calidad de la impresión y la respuesta lineal del reconocimiento de los anticuerpos usados se utilizó una curva creciente de extracto de proteínas de células HCT-116 procedentes de carcinoma de colon (diluido 0-0,8 mg/ml) y otra curva creciente de BSA (1 mg/ml) como control negativo. Thyphoon 9410 scanner permite determinar la fluorescencia emitida por cada muestra y que será proporcional al número de complejos antígeno-anticuerpo. La cuantificación de esta fluorescencia se realizó con el programa Fiji (N.I.H., USA), las unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia se convirtieron a ng de proteína total en el extracto de tejido usando la expresión obtenida en la recta patrón estándar de las células HCT-116 y se normalizaron respecto a β -actina en cada tejido.

2.3.4. Detección de proteínas carboniladas en tejidos de ratón

El análisis de la carbonilación de proteínas se llevó a cabo utilizando el kit *OxyBlot protein oxidation detection* de Millipore.

Para la extracción de las proteínas a partir de tejidos se siguió el protocolo descrito en el apartado 2.3.1. de esta sección y se utilizó el método de Bradford para la cuantificación proteica. En primer lugar, se realiza la derivatización de 15 μ g de proteína añadiendo a cada muestra 6 μ l de SDS al 10% y 8 μ l de solución 2, 4-dinitrofenilhidrazona (DNPH) e incubando éstas durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación, se añaden 6 μ l de buffer de neutralización y 5 μ l de tampón de carga y se procede a cargar todo el volumen en geles *NuPAGE Bis-Tris* al 10% utilizando como tampón de electroforesis MES, realizando la separación, electrotransferencia e inmunodetección como se describe en el apartado B de esta sección. Los anticuerpos primario y secundario se diluyeron 1/150 y 1/300, respectivamente, en BSA 1% y TBS-Tween 0,05%.

2.4. Ensayos enzimáticos

2.4.1. Actividad propionil-CoA carboxilasa

La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por (Suormala et al. 1985). Para ello, el precipitado de fibroblastos se resuspende en tampón Tris-HCl 20 mM pH 8 y glutatión 0,025% (p/v) tras lo que las muestras se someten a tres ciclos de congelación/descongelación en N₂ líquido y 37°C para la obtención del extracto proteico.

El volumen final de la reacción contiene 20 μ moles de Tris-HCl pH 8; 0,15 μ moles de DTT; 0,628 μ moles de Na₂-ATP·3H₂O; 1,2 μ moles de MgCl₂·6H₂O; 20 μ moles de KCl; 5% v/v de Tritón-X100; 0,2 μ moles de propionil-CoA; 8 μ moles de NaHCO₃ y 8 μ moles del isótopo radiactivo NaH[¹⁴C]O₃ con una actividad de 58 μ Ci/ μ mol.

La reacción enzimática se dispara con la adición de 30 μ l del extracto proteico, tras lo que las muestras se incuban a 30°C durante 20 min. La reacción enzimática se detiene con la adición de 140 μ l de TCA 30% (p/v) que junto con una centrifugación a máxima velocidad durante 15 min favorece la separación de las proteínas precipitadas. 250 μ l del sobrenadante se transfieren a un vial de centelleo que se somete a evaporación a temperatura ambiente durante un periodo de 24-48 horas. Posteriormente, el precipitado se resuspende en 500 μ l de agua mili-Q a lo que se añaden 5 ml de líquido de centelleo *OptiFluor* (Perkin Elmer) para la posterior determinación de las cuentas por minuto (cpm) a las 24 horas en un contador 1209 *Rackbeta Liquid Scintillation Counter* (Wallac). La actividad específica residual PCC se expresa en pmoles [¹⁴C] incorporado min⁻¹ mg⁻¹ proteína total. La cuantificación de proteína de los extractos se llevó a cabo por el método de Bradford.

2.4.2. Actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial

La medida de las actividades enzimáticas de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial fue realizada por el grupo de Miguel Ángel Martín en el Hospital 12 de octubre de Madrid.

Para ello, los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de hidrato cloral y posteriormente perfundidos transcárdialmente en frío con suero salino (NaCl 0,9%) con el fin de eliminar satisfactoriamente los restos de hemoglobina que puede interferir en la medida de la actividad de los complejos. Se extrajeron 20-30 mg de cerebro e hígado de los ratones, se congelaron rápidamente en N₂ líquido y se llevaron al Hospital 12 de octubre en nieve carbónica.

La determinación de la actividad se llevó a cabo según los métodos previamente descritos (Martin et al. 2005; Martinez et al. 2001; Smeitink et al. 2001). Los valores obtenidos en ambos tejidos se normalizaron respecto de la actividad citrato sintasa.

2.5. Detección de daño oxidativo a lípidos

2.5.1. Determinación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Los ratones utilizados en este ensayo fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de hidrato cloral y, una vez dormidos, fueron perfundidos transcárdialmente con suero salino (NaCl 0,9%). Tras ello, se aislaron cerebro, corazón e hígado y se congelaron inmediatamente en N₂ líquido. Aproximadamente 50-100 mg de tejido se homogenizaron en 1 ml de BHT (butilhidroxitolueno) diluido en PBS utilizando *IKA ultraturrax* (rondas de 10 pases). El homogenado se centrifuga a 4°C durante cinco minutos a 10000 g y se guarda el sobrenadante a 4°C para su posterior utilización en el ensayo.

La cantidad de malondialdehído (MDA) en cada tejido se midió con el kit *OxiSelect TBARS assay kit*, para lo que es necesario realizar una recta patrón estándar de concentraciones conocidas de MDA. Tanto las muestras a analizar como los estándares de MDA se incuban con 100 µl de tampón de lisis con SDS durante 5-10 min a temperatura ambiente. A continuación, se añaden 250 µl de ácido tiobarbitúrico y se incuban las muestras a 95°C durante 60 min. Tras ello, las muestras se enfrían en hielo durante cinco minutos y se centrifugan a 800 g durante 15 min. Además, y como un paso adicional para asegurar la completa eliminación de restos de hemoglobina que pueden interferir en el ensayo, se transfieren 300 µl de los sobrenadantes a nuevos eppendorff y se incuban con 300 µl de n-butanol durante uno o dos minutos en agitación. Finalmente, se centrifugan las muestras a 9300 g durante cinco minutos y se transfieren 150 µl del sobrenadante a una placa de 96 pocillos. La fluorescencia a 540/590 nm (y/o absorbancia a 532 nm) se mide en un lector de placas FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH). La concentración de MDA por muestra se obtiene de la interpolación de los valores obtenidos en la recta patrón estándar y la normalización respecto a la cantidad de proteína del homogenado, cuantificada por el método de Bradford.

2.5.2. Determinación de los niveles de isoprostanos

Para la cuantificación de isoprostanos (IsoPs), los animales se sacrificaron en una cámara con CO₂, y cerebro e hígado fueron aislados. Aproximadamente 100 mg de ambos tejidos se procesaron de acuerdo con lo descrito en (Milne et al. 2013). El procesado del extracto lipídico y posterior cuantificación de los isoprostanos fue llevada a cabo por el laboratorio de A. Gil-Izquierdo (CEBAS-CSIC, Murcia). Brevemente, se resuspende el extracto lipídico seco en 1 ml de metanol con hidroxibutilanisol (BHA, Sigma-Aldrich) al 0,005%. A continuación, se añade 1 ml de KOH acuoso (15% v/v) y se centrifugan las muestras cinco minutos a 11000 g. Los sobrenadantes se someten a

una fase de extracción sólida según el procedimiento previamente descrito (Medina et al. 2012a; Medina et al. 2012b) con pequeñas modificaciones.

La separación de los IsoPs presente en las muestras de tejido se llevó a cabo usando UHPLC acoplado al sistema 6450QqQ-MS/MS (Agilent Technologies). Los IsoPs sintéticos incluyeron 8-iso-PGF_{2α}, 8-iso-15-ceto-PGF_{2α}, 8-iso-PGF_{2β}, 8-iso-15(R)-PGF_{2α}, 2,3-dinor-8-iso-PGF_{2α}, *ent*-PGF_{2α}, *ent*-8-iso-15S-PGF_{2α}, 8-iso-15-ceto-PGE₂, 8-iso-PGF_{1α} y 8-iso-PGE₁ de *Cayman Chemicals*. La adquisición de los datos y el procesamiento se realizó usando el software *MassHunter* versión B.04.00 (Agilent Technologies) (Moita et al. 2013).

2.6. Determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno mitocondrial *in vivo*

El análisis de los niveles *in vivo* de peróxido de hidrógeno mitocondriales se llevó a cabo mediante el empleo de la sonda dirigida a la mitocondria conocida como ácido MitoBorónico o MitoB. MitoB es un catión de trifenilfosfonio (TPP) conjugado al ácido arilborónico que, al inyectarse de manera intravenosa, se acumula en la mitocondria donde reacciona selectivamente con H₂O₂, formándose así el marcador MitoP (Cocheme et al. 2011; Cocheme et al. 2012). Para el estudio, y tal como se ha descrito previamente (Logan et al. 2014), se administró de manera intravenosa (i.v.) una dosis de 3 nmol/g de MitoB disuelto en suero salino en ratones *wild-type* y *Pcca*^{-/-} (A138T). Después de seis horas, los animales se sacrificaron y se aislaron corazón e hígado, que inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido y almacenaron a -80°C. Para el análisis, las muestras se homogenizan en una solución de acetonitrilo al 60% (vol/vol) y ácido fórmico al 0,1% (vol/vol) con el homogenizador *IKA ultraturrax* y se mezclan con estándares internos deuterados. El homogenado se filtra usando filtros de 0,22 μm y se concentra en un Thermo Scientific™ Savant™ SPD131DDA SpeedVac™ Concentrator. Las muestras se enviaron al laboratorio de Michael P. Murphy (Cambridge, Inglaterra) para su cuantificación por cromatografía líquida y espectrometría de masas en tandem (Cocheme et al. 2011; Cocheme et al. 2012).

2.7. Técnicas histológicas, microscopía óptica y confocal

2.7.1. Preparación de muestras histológicas

Los animales se anestesian con una inyección intraperitoneal de hidrato cloral. Una vez dormidos se realiza una perfusión transcardial con suero salino al 0,9%, se extraen corazón y cerebro y se mantienen en PBS a 4°C hasta su fijación con formalina al 10% durante 24 horas a temperatura ambiente o 48 horas a 4°C. Las muestras fueron procesadas por el servicio de histología del Centro Nacional de Biotecnología según el siguiente protocolo:

Procesamiento para cortes en OCT (componente de Temperatura de Corte Óptima): los órganos fijados en formalina se lavan tres veces en PBS durante 15 min y se incuban en sacarosa 30% durante una noche a 4°C, tras lo que se incluyen en bloques de OCT (Tissue-Tek 4583 sakura) que se tallan y cortan con un criostato CM 1900 (Leica) en secciones seriadas. Los cortes de corazón se realizaron en longitudinal y los de cerebro en coronal, ambos de 20 µm de grosor. Las secciones se recogen directamente del criostato por adherencia al portaobjetos *Superfrost ultra plus* y se congelan a -80°C.

2.7.2. Detección de radical superóxido con la sonda dihidroetidio (DHE)

Se utilizaron cortes histológicos (20 µm de grosor) criopreservados en OCT de corazón y cerebro de ratones *wild-type* y *Pcca*^{-/-}(A138T) preparados como se ha indicado en la sección anterior. Las muestras se descongelan durante 2-3 horas a temperatura ambiente antes de su uso. En primer lugar, se elimina la autofluorescencia mediante la incubación de los cortes en NH₄Cl 50 mM durante 10 min. Tras ello, se lava 15 min con PBS y se incuba en solución de bloqueo (**Tabla 2**) durante al menos 30 min con el fin de bloquear la autofluorescencia de los grupos aldehído. Se lava la solución de bloqueo con PBS y se incuba con DAPI (1/1000) durante toda la noche en agitación suave. Una vez eliminado el exceso de DAPI con tres lavados de 15 min con PBS, los cortes se incuban con DHE 10 µM durante 45 min a 37°C en una cámara humidificada y protegida de la luz. Los cortes se vuelven a lavar tres veces con PBS durante 15 min tras lo que se incuban 5 min con etanol al 70% y con un análogo de Sudan-Black (*autofluorescence eliminator reagent*) otros 5 min para reducir la autofluorescencia de los tejidos. Finalmente, se realizan tres lavados con etanol al 70%, se monta la preparación con 4 µl de *prolong gold antifade* por corte y se deja secar durante una hora a temperatura ambiente. Las muestras fueron visualizadas en un microscopio de barrido láser confocal LSM710 acoplado a un microscopio vertical Axiolmager.M2 (Zeiss) con software ZEN 2010. Se tomaron al menos diez fotos por corte con un objetivo de 40x y las imágenes, al menos de 4-6 cortes por muestra, fueron analizadas con el programa Fiji (N.I.H., USA) para calcular la media de la intensidad de fluorescencia.

2.8. Tratamiento *in vivo* con MitoQ y resveratrol

Los ratones *wild-type* y *Pcca*^{-/-}(A138T) se trataron con soluciones orales de MitoQ (250 µM), teniendo en cuenta que la administración de dosis superiores a 500 µM carece de efectos tóxicos y no afecta el peso del animal o su consumo de agua y comida (Rodríguez-Cuenca et al. 2010), o resveratrol (30 mg/L). Las soluciones de MitoQ y de resveratrol se prepararon frescas dos veces a la semana y se administraron en biberones protegidos de la luz. MitoQ se administró durante tres

meses y resveratrol durante dos meses. La toma de agua fue monitorizada semanalmente hasta el fin del estudio.

2.9. Análisis *in silico*

El potencial efecto patogénico de las variantes se analizó utilizando los *softwares* bioinformáticos *PolyPhen-2*, *SIFT*, *MutPred* y *Mutation Taster*. Estos programas predicen, teniendo en cuenta la homología de secuencias y las propiedades de los aminoácidos, la patogenicidad que genera la sustitución de un aminoácido sobre la estructura y función de la proteína de estudio.

Por otro lado, el análisis estructural de las variantes en *PCCA* y *PCCB* se llevó a cabo en un modelo de homología generado a partir la estructura cristalizada de la holoenzima de *Ruegeria pomeroyi* (código de acceso PDB 3n6r) (Huang et al. 2010), compuesta por subunidades α y β que comparten un 54% y un 65% de identidad de secuencia con las respectivas subunidades humanas. Además, la subunidad α fue modelada a partir de la análoga de *S. aureus* unida a la molécula de ATP (código de acceso PDB 2vpq) (Mochalkin et al. 2008) y la biotina y el bicarbonato unidos al sitio activo del dominio biotina carboxilasa (BC) incorporados a la estructura de *E. coli* (código de acceso PDB 3g8c) (Chou et al. 2009).

Para los estudios *in silico* sobre la función de los miRNAs se utilizaron las siguientes bases de datos: *miRBase*, *MirTarBase* y *TargetScan* para el análisis de sus dianas, *DIANA TOOLS-miRPath* para la predicción de las vías reguladas por ellos y *Human miRNA Tissue Atlas* para determinar los tejidos en los que se expresan.

2.10. Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados utilizando el software IBM SPSS Statistics para Windows versión 23.0 (IBM Corp.). Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar y la significatividad estadística de las diferencias entre los grupos se calculó usando la prueba t de Student o ANOVA seguido de la correspondiente prueba post hoc (*Tukey's honestly significant difference*, *HSD*, o *Games Howell post hoc test*). Las diferencias observadas se consideraron significativas según los p valores * < 0,05, ** < 0,01 y *** < 0,001.

RESULTADOS

1. Caracterización de nuevas variantes en <i>PCCA</i> y <i>PCCB</i> causantes de acidemia propiónica	69
1.1. Análisis del efecto de variantes <i>missense</i> sobre la estructura y la actividad de PCC	69
1.2. Análisis del efecto del crecimiento de fibroblastos de pacientes en condiciones permisivas de plegamiento	76
2. Estudio <i>in vivo</i> de la función mitocondrial y de la homeostasis redox como vías que contribuyen a la fisiopatología de la acidemia propiónica	77
2.1. Evaluación de la función mitocondrial	77
2.1.1. Análisis cuantitativo de proteínas del metabolismo energético	77
2.1.2. Análisis de la actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones	80
2.1.3. Análisis del contenido de DNA mitocondrial	81
2.2. Evaluación de la homeostasis redox	81
2.2.1. Análisis de la producción de ROS: determinación de los niveles de radical superóxido y de peróxido de hidrógeno	82
2.2.2. Análisis del daño oxidativo a proteínas, lípidos y DNA	83
2.3. Evaluación de parámetros relacionados con la muerte celular	86
3. Efecto del tratamiento con MitoQ y resveratrol en el modelo murino de acidemia propiónica	89
3.1. Análisis del daño oxidativo a lípidos y DNA	89
3.2. Análisis de los niveles de enzimas antioxidantes	90
3.3. Análisis del marcador de muerte celular CYPD	93
3.4. Análisis del marcador de daño cardíaco BNP	94
4. Identificación y caracterización de miRNAs desregulados en el modelo murino de acidemia propiónica	95
4.1. Perfil hepático de miRNAs	95
4.2. Análisis de la expresión de miR-34a-5p, miR-338-3p y miR-350	98
4.3. Análisis de las potenciales dianas de miR-34a-5p	99
4.4. Análisis de la expresión de miRNAs específicos de cerebro	101
5. Identificación de miRNAs circulantes en acidemia propiónica	105
5.1. Identificación de miRNAs alterados en el plasma del modelo murino	105
5.2. Identificación de miRNAs alterados en el plasma de pacientes	106

1. Caracterización de nuevas variantes en PCCA y PCCB causantes de acidemia propiónica

Dentro de las diferentes variantes alélicas identificadas en pacientes con AP, los cambios *missense* son los más frecuentes tanto en PCCA como en PCCB. En esta primera parte del trabajo se han analizado un total de 22 variantes no descritas previamente: 21 cambios *missense*, 11 en PCCA y 10 en PCCB, y una pequeña delección en fase localizada en PCCB. La predicción de la patogenicidad se llevó a cabo mediante un análisis *in silico* utilizando diferentes *softwares* bioinformáticos. Además, se determinó el efecto de dichas variantes sobre la estructura proteica, basándonos en un modelo de homología de la holoenzima PCC humana, y sobre la función utilizando un sistema *in vitro* de expresión eucariota para la posterior medida de la actividad PCC y de los niveles de la proteína correspondiente PCCA o PCCB. Asimismo, y en el caso de estar disponibles, se crecieron líneas de fibroblastos de pacientes portadores de alguna de estas mutaciones en condiciones permisivas de plegamiento con el fin de determinar el impacto en la estabilidad del enzima.

1.1. Análisis del efecto de variantes *missense* sobre la estructura y la actividad de PCC

Muestras de 23 pacientes con sospecha de AP, cuyos datos disponibles se recogen en la **tabla 8**, fueron referidas al Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares para su diagnóstico genético. Un total de 22 nuevas variantes de significado clínico incierto fueron identificadas (**Figura 6**): 11 de los cambios nucleotídicos se localizaron en PCCA y potencialmente resultan en variantes de tipo *missense*; las 11 variantes restantes se localizaron en PCCB, siendo 10 de ellas de tipo *missense* y otra un cambio que provoca la delección en fase de un aminoácido (**Tabla 9**).

Con el fin de determinar el posible efecto patogénico de las variantes se realizó un análisis *in silico* en el que se utilizaron los *softwares* bioinformáticos *PolyPhen-2*, *SIFT*, *MutPred* y *Mutation Taster*. Como se indica en la **tabla 9**, la mayor parte de las variantes recogidas en el estudio se predicen como patogénicas por los diferentes *softwares*, exceptuando los cambios p.C712S en PCCA y p.G356R en PCCB que fueron clasificados como neutrales por *PolyPhen-2* pero como patogénicos por el resto.

Tabla 8. Genotipo y datos disponibles sobre el fenotipo de pacientes con AP portadores de las variantes incluidas en el estudio

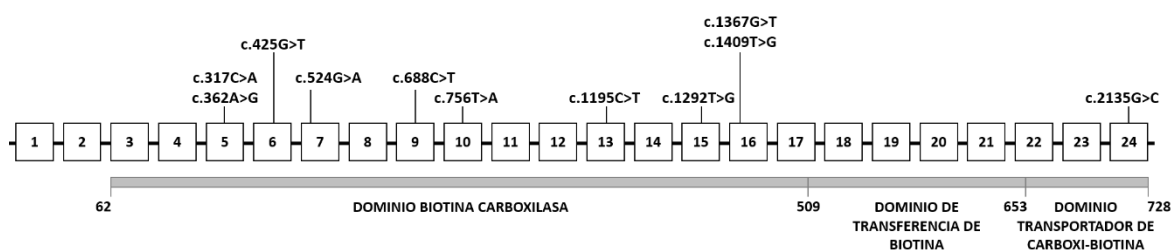
Gen deficiente	Paciente	Genotipo	Presentación	Datos clínicos disponibles
PCCA	P1	[c.317C>A] + [c.317C>A]	Neonatal	Presentación severa, hipotonía, taquipnea, acidosis metabólica
	P2	[c.362A>G] + [c.362A>G]	n.d.	n.d.
	P3	[c.425G>T] + [c.425G>T]	n.d.	n.d.
	P4	[c.443delA] + [c.524G>A]	Neonatal	Presentación severa, hiperamonemia, descompensaciones metabólicas
	P5	[c.600+1G>A] + [c.1367G>T]	Neonatal	n.d.
	P6	[c.688C>T] + [c.184-618_300+3940]*	Tardía (2 años)	Acidosis metabólica, letargia
	P7	[c.756T>A] + n.d.	Infancia temprana	Presentación severa con encefalopatía y acidosis metabólica. En la actualidad, adulto con retraso psicomotor severo
	P8	[c.1195C>T] + [c.1195C>T]	Neonatal	Presentación severa
	P9	[c.1218C>G] + [c.1292T>G]	Neonatal	Deterioro neurológico, hipotonía
	P10	[c.1409T>G] + [c.1409T>G]	Neonatal	Presentación severa, infección dérmica, anemia, hepatomegalia, hiperamonemia, deterioro neurológico, hipotonía severa
	P11	[c.1409T>G] + [c.1409T>G]	Neonatal	Presentación severa, hipotonía, dificultad en la alimentación
	P12	[c.1409T>G] + [c.1409T>G]	Neonatal	Presentación severa, descompensaciones metabólicas. Exitus a los 4 años
	P13	[c.2135G>C] + n.d.	Cribado neonatal	n.d.
PCCB	P14	[c.173A>C] + [c.1218_1231del13ins12]*	n.d.	Adulto con fenotipo suave
	P15	[c.503_505del] + [c.683C>T]*	Tardía	Complicaciones cardíacas y neurológicas, MELAS
	P16	[c.563G>C] + [c.563G>C]	Tardía	Fenotipo suave
	P17	[c.748C>T] + [c.1218_1231del13ins12]*	n.d.	n.d.
	P18	[c.814C>T] + [c.737G>T]*	Tardía (14 meses)	Convulsiones con fiebre
	P19	[c.947T>G] + [c.1146T>A]	Neonatal	Presentación severa con hipotonía e hiperamonemia 48 horas tras el nacimiento
	P20	[c.1066G>C] + [c.1218_1231del13ins12]*	n.d.	n.d.
	P21	[c.1379T>C] + [c.1399-2_-1del]	Cribado neonatal	n.d.
	P22	[c.1535G>A] + [c.493C>T]*	Cribado neonatal	n.d.
	P23	[c.1601A>G] + [c.1218_1231del13ins12]*	Neonatal	Presentación severa, taquipnea, rechazo al alimento. Descompensaciones metabólicas recurrentes con convulsiones. A los 7 años, hipotonía, retraso psicomotor y del habla

* Variante previamente descrita (HGMD Professional Release 2018.1). La nomenclatura de las variantes ha sido actualizada de acuerdo con *Human Genome Variation Society* o HGVS (<http://varnomen.hgvs.org/>)

n.d. no hay datos

En negrita se resaltan las variantes incluidas en el estudio

A) *PCCA*



B) *PCCB*

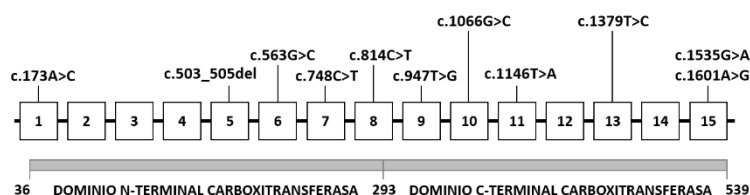


Figura 6. Nuevas variantes identificadas en los genes *PCCA* y *PCCB* causantes de AP. Representación esquemática de la estructura genómica de *PCCA* (panel A) y *PCCB* (panel B), mostrando la localización de las variantes identificadas. En *PCCA* se muestran los dominios biotina carboxilasa (BC), transportador de carboxi-biotina (BCCP) y de transferencia de biotina (BT). El dominio BC (del aminoácido 62 al 509) cataliza la carboxilación de la biotina, cofactor unido al dominio BCCP, en un proceso dependiente de ATP y Mg^{++} . El dominio BT es esencial para la interacción con el dominio carboxitransferasa (CT) en la subunidad β , codificada por el gen *PCCB*. El dominio CT es el responsable de transferir el grupo carboxilo de la biotina al carbono α del propionil-CoA. Los números indicados corresponden a los aminoácidos en la secuencia proteica de *PCCA* y *PCCB*.

Para evaluar el efecto de las variantes sobre la estructura se utilizó un modelo de homología de la holoenzima PCC humana (Gallego-Villar et al. 2013). El hetero-tetramero $\alpha\beta\beta\alpha$ se visualizó con el programa *Pymol* y las diferentes variantes se mapearon *in silico* (Figura 7 y 8). El estudio reveló que la mayor parte de las variantes analizadas afectan la estructura del enzima PCC (Tabla 9), promoviendo fundamentalmente la desestabilización de la proteína debido a la aparición de impedimentos estéricos, generados por cambios en la naturaleza de los aminoácidos, así como por la pérdida o ganancia de interacciones con otros residuos.

Además, de entre las variantes en *PCCA*, los cambios p.G175D y p.R399W (Figura 7D y 7G y tabla 9) distorsionarían el centro activo del enzima al encontrarse localizados en el dominio de unión al ATP, Mg^{++} y Cl^- , necesarios para su correcto funcionamiento. Por otro lado, el análisis de los cambios p.C712S en *PCCA* y p.Q58P, p.G188A y p.H534R en *PCCB* indicó que éstos no tendrían un efecto sustancial en la estructura de PCC: p.C712S y p.G188A están localizadas en una región flexible de la cadena polipeptídica y ninguna interacción se ve afectada por la correspondiente sustitución aminoacídica (Figura 7K y 8C y tabla 9), mientras que p.Q58P provocaría una distorsión de la hélice α al inicio de la cadena polipeptídica y las interacciones perdidas como consecuencia del cambio p.H534R serían compensadas por el establecimiento de otras (Figura 8A y 8K y tabla 9).

Tabla 9. Variantes de tipo *missense* y deleción en fase analizadas en este trabajo

Gen	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	Polyphen-2 (score) ¹	SIFT (score) ²	MutPred (score) ³	Mutation Taster ⁴	Proteína (%)	Actividad (%)	Predicción estructural	Fenotipo ⁵
PCCA	c.317C>A	p.A106E	P (1,00)	P (0,00)	0,881	P	0	0,5	Desestabilización	Severo
	c.362A>G	p.Y121C	P (1,00)	P (0,00)	0,778	P	1,4	0,8	Desestabilización	n.d.
	c.425G>T	p.G142V	P (1,00)	P (0,00)	0,971	P	0	0	Desestabilización	n.d.
	c.524G>A	p.G175D	P (0,98)	P (0,00)	0,789	P	1,7	1	Distorsión del centro activo	Severo
	c.688C>T	p.R230C	P (1,00)	P (0,00)	0,779	P	25	7,1	Desestabilización	Moderado
	c.756T>A	p.S252R	P (0,97)	P (0,00)	0,593	P	3,4	1,7	Desestabilización	n.d.
	c.1195C>T	p.R399W	P (1,00)	P (0,00)	0,929	P	0	0	Distorsión del centro activo	Severo
	c.1292T>G	p.V431G	P (0,90)	P (0,01)	0,806	P	0	2,4	Desestabilización	Severo
	c.1367G>T	p.G456V	P (1,00)	P (0,00)	0,862	P	0	0,9	Desestabilización	n.d.
	c.1409T>G	p.L470R	P (1,00)	P (0,00)	0,865	P	0	1	Desestabilización	Severo
PCCB	c.2135G>C	p.C712S	N (0,22)	P (0,30)	0,747	P	2,4	8,3	Sin cambio sustancial	n.d.
	c.173A>C	p.Q58P	P (1,00)	P (0,00)	0,697	P	83	0	Sin cambio sustancial	Moderado
	c.503_505del	p.E168del	-	-	-	P	20.5	0,5	Desestabilización	n.d.
	c.563G>C	p.G188A	P (1,00)	P (0,00)	0,814	P	46	88,3	Sin cambio sustancial	Moderado
	c.748C>T	p.H250Y	P (1,00)	P (0,00)	0,836	P	3,5	0,5	Desestabilización	n.d.
	c.814C>T	p.R272W	P (1,00)	P (0,00)	0,750	P	2,1	12,2	Desestabilización	n.d.
	c.947T>G	p.M316R	P (1,00)	P (0,00)	0,858	P	0	0	Desestabilización	Severo ⁶
	c.1066G>C	p.G356R	N (0,12)	P (0,01)	0,931	P	0	0	Desestabilización	n.d.
	c.1146T>A	p.D382E	P (0,98)	P (0,00)	0,800	P	1,6	4,5	Desestabilización	Severo ⁶
	c.1379T>C	p.I460T	P (1,00)	P (0,00)	0,855	P	40	1	Desestabilización	n.d.
	c.1535G>A	p.R512H	P (1,00)	P (0,00)	0,940	P	2	1,6	Desestabilización	n.d.
	c.1601A>G	p.H534R	P (1,00)	P (0,00)	0,836	P	23	15	Sin cambio sustancial	Severo

¹PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>): rango del *score* de 0 (neutral, N) a 1 (patogénico, P) / ²SIFT (<http://sift.jcvi.org/>): rango del *score* de 0 (patogénico, P) a 1 (neutral, N)

³MutPred (<http://mutpred.mutdb.org/>): variantes con *scores* > 0,5 se predicen como patogénicas / ⁴Mutation taster (<http://www.mutationtaster.org/>): P, patogénica

⁵En homocigosis o pacientes hemigotos funcionales; n.d. sin datos / ⁶Ambas mutaciones se encuentran en *trans* en P19

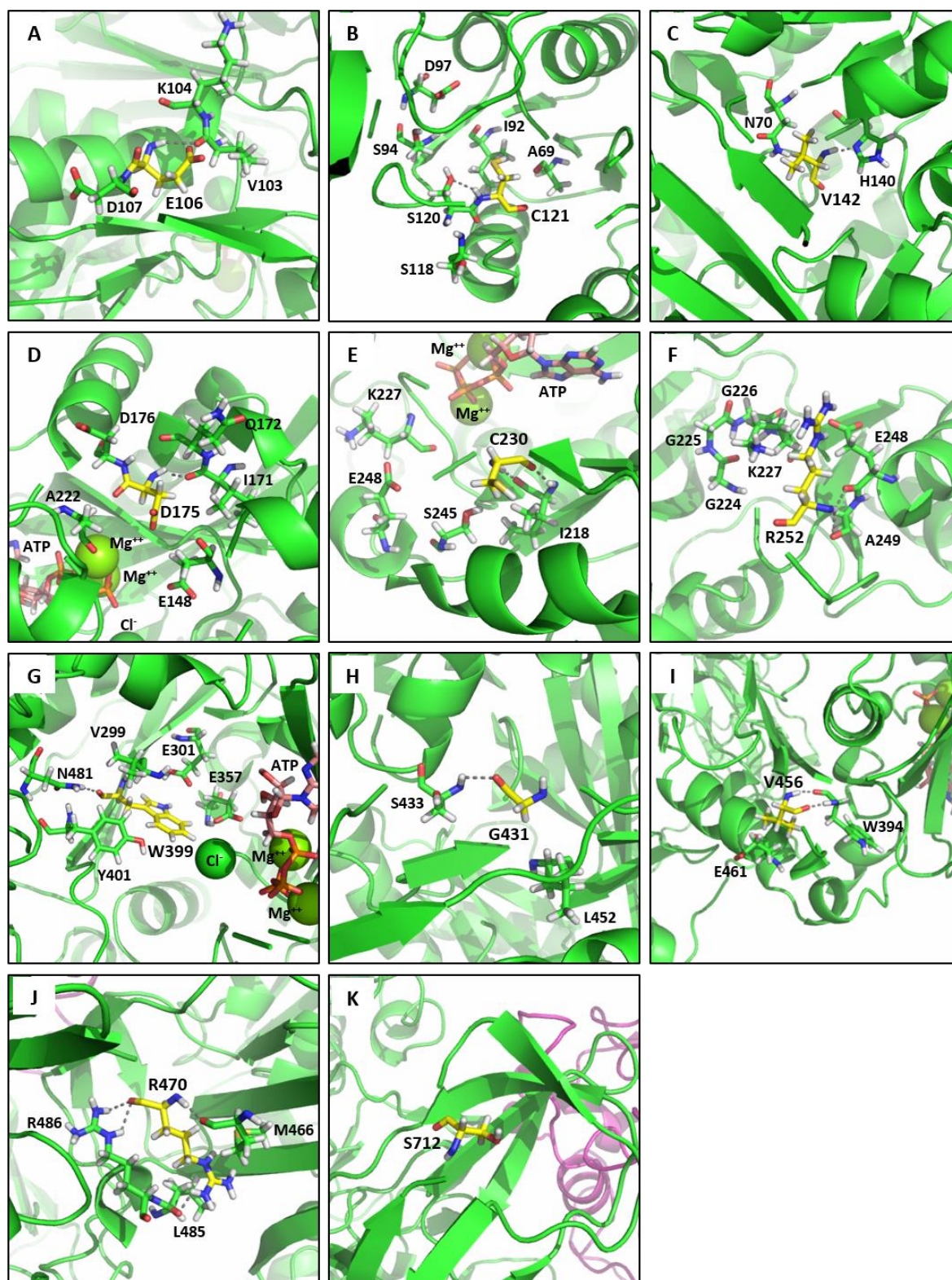


Figura 7. Localización de las variantes en estudio en la subunidad α de la PCC. Representación gráfica de la región catalítica de la subunidad α (verde) y de la interfase entre subunidades β - β (magenta y azul) usando el *software Pymol*. Los residuos proteicos afectados por las variantes y los aminoácidos implicados en interacciones clave se muestran en palos donde los átomos se presentan según el siguiente código de colores: carbono en amarillo para los residuos mutados y verde para los restantes, nitrógeno en azul, oxígeno en rojo y azufre en naranja. El magnesio y el cloro se representaron como esferas. Variantes en PCCA A) p.A106E, B) p.Y121C, C) p.G142V, D) p.G175D, E) p.R230C, F) p.S252R, G) p.R399W, H) p.V431G, I) p.G456V, J) p.L470R y K) p.C712S.

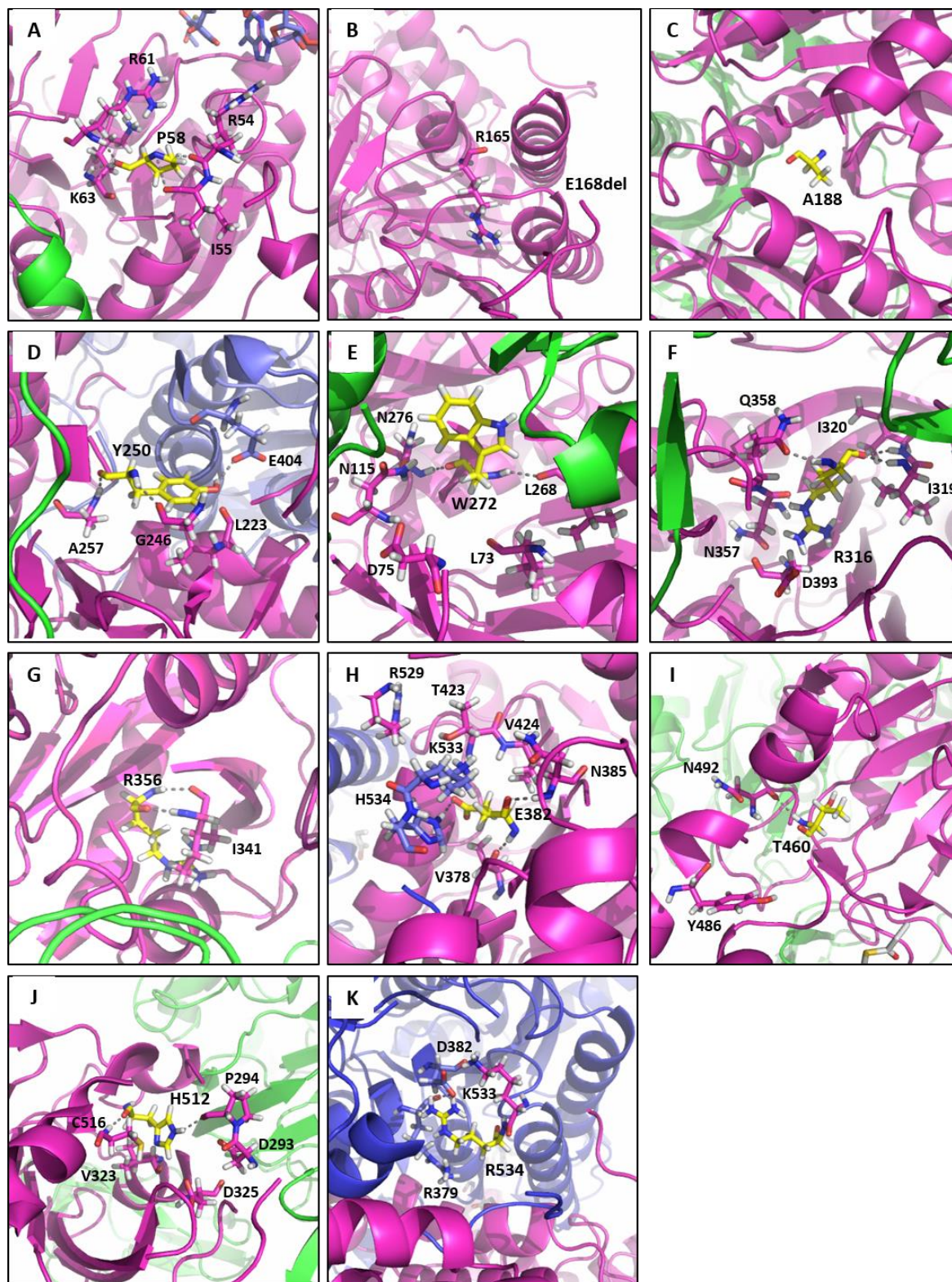
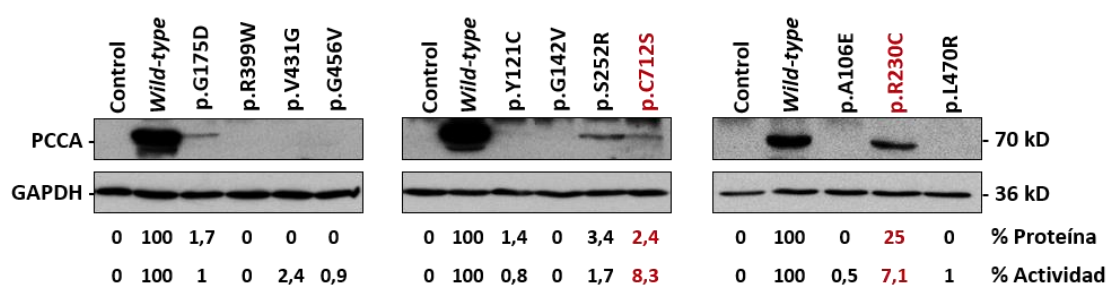


Figura 8. Localización de las variantes en estudio en la subunidad β de la PCC. Representación gráfica de la región catalítica de la subunidad α (verde) y de la interfase entre subunidades β - β (magenta y azul) usando el *software* *Pymol*. Los residuos proteicos afectados por las variantes y los aminoácidos implicados en interacciones clave se muestran en palos, donde los átomos se presentan según el siguiente código de colores: carbono en amarillo para los residuos mutados y verde para los restantes, nitrógeno en azul, oxígeno en rojo y azufre en naranja. El magnesio y el cloro se representaron como esferas. Variantes en PCCB **A)** p.Q58P, **B)** p.E168del, **C)** p.G188A, **D)** p.H250Y, **E)** p.R272W, **F)** p.M316R, **G)** p.G356R, **H)** p.D382E, **I)** p.I460T, **J)** p.R512H y **K)** p.H534R.

Para confirmar la patogenicidad de las variantes y corroborar las observaciones del análisis *in silico* y estructural, se decidió realizar un análisis funcional utilizando un sistema *in vitro* de expresión eucariota. Así, se utilizaron líneas de fibroblastos transformados procedentes de pacientes deficientes para *PCCA* y *PCCB* (5626T y 14046T, respectivamente) para expresar las diferentes variantes y, posteriormente, medir la actividad PCC y los niveles de la correspondiente proteína *PCCA* o *PCCB*. Tal y como se recoge en la **figura 9** y en la **tabla 9**, las variantes p.C712S y p.R230C en *PCCA* retienen un 7-8% de actividad PCC y un 2,4% y un 25% de niveles de proteína *PCCA*, respectivamente, mientras que el resto de cambios presentaron una actividad PCC y niveles de proteína *PCCA* muy bajos o nulos (**Figura 9A**).

En cuanto a *PCCB*, las variantes pueden clasificarse en cambios que resultan en actividad PCC y niveles de proteína *PCCB* muy bajos o nulos (p.M316R, p.D382E, p.H250Y, p.G356R, y p.R512H), variantes sin actividad pero que retienen niveles variables de proteína (p.E168del, p.Q58P y p.I460T) y variantes con cierta actividad PCC y proteína (p.R272W, p.H534R y p.G188A) (**Figura 9B**).

A) PCCA



B) PCCB

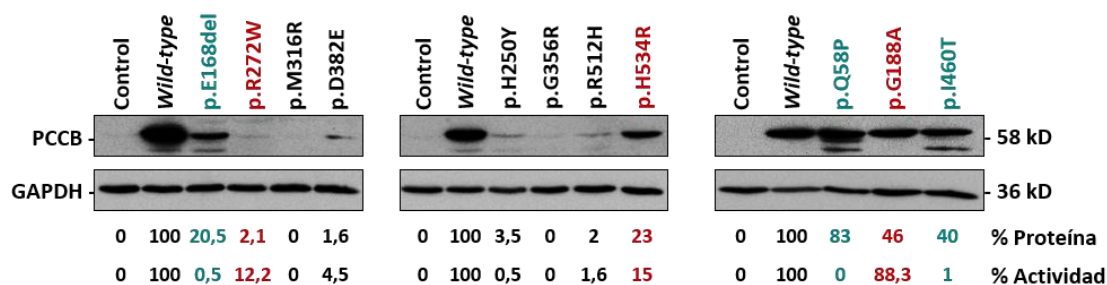


Figura 9. Análisis funcional de las variantes en *PCCA* y *PCCB*. Western blot representativo de al menos dos experimentos para la detección de la proteína *PCCA* (**panel A**) y *PCCB* (**panel B**) procedente de lisados de fibroblastos deficientes en *PCCA* o *PCCB*, respectivamente, co-transfectados con la construcción *PCCA* o *PCCB* mutante y la respectiva *PCCB* o *PCCA* wild-type. Los controles corresponden a las líneas celulares no transfectadas. GAPDH se utilizó como control de carga. Los datos representan el porcentaje de proteína *PCCA* o *PCCB* mutante respecto de los niveles de la construcción wild-type (100%). En negro se recogen las mutaciones que resultan en niveles muy bajos o nulos de proteína y actividad PCC, en azul se representan las variantes sin actividad pero con niveles variables de proteína y en rojo los cambios que retienen cierta actividad PCC y proteína.

1.2. Análisis del efecto del crecimiento de fibroblastos de pacientes en condiciones permisivas de plegamiento

Dado que la mayor parte de las variantes del estudio afectan la estabilidad de la proteína PCC se decidió analizar la posible recuperación de la actividad y de los niveles de proteína bajo condiciones permisivas de plegamiento. Así, se crecieron a 37°C y 28°C líneas disponibles en el laboratorio de fibroblastos de los pacientes 6, 13 y 17, portadores en heterocigosis de las variantes p.R230C (PCCA), p.C712S (PCCA) y p.H250Y (PCCB), respectivamente, para la posterior medida de la actividad PCC y de los niveles de proteína PCCA o PCCB. A 37°C la actividad PCC fue prácticamente indetectable en las muestras de pacientes respecto de los fibroblastos control (**Figura 10A**). El crecimiento a 28°C supuso un ligero incremento de la actividad PCC en las líneas procedentes de los pacientes 6 y 13, siendo significativo en el segundo caso (**Figura 10A**), y de los niveles de proteína PCCA en los fibroblastos del paciente 6 (**Figura 10B**) y de PCCB en los del paciente 17 (**Figura 10C**).

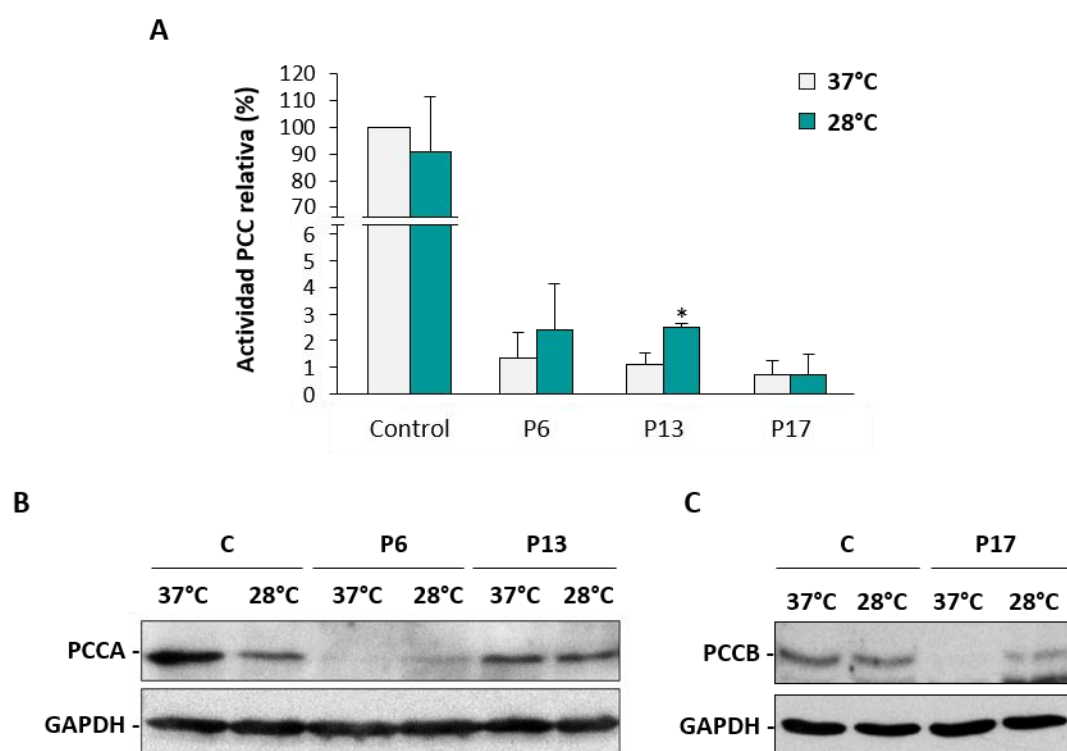


Figura 10. Análisis del efecto del crecimiento en condiciones permisivas de plegamiento. Las líneas de fibroblastos control y de los pacientes 6, 13 y 17 se crecieron a 37°C y 28°C para la posterior medida de la actividad PCC (**panel A**) y de los niveles de proteína PCCA (**panel B**) o PCCB (**panel C**) por western blot. Los resultados de la actividad PCC se representan como actividad relativa respecto de los niveles de la línea control crecida a 37°C (100%) y muestran el promedio y la desviación estándar de al menos cuatro experimentos. Análisis estadístico t de Student (*p<0,05). Los paneles B y C recogen los blots representativos de al menos dos experimentos para la detección de PCCA y PCCB, utilizando GAPDH como control de carga.

2. Estudio *in vivo* de la función mitocondrial y de la homeostasis redox como vías que contribuyen a la fisiopatología de la acidemia propiónica

La AP es una enfermedad caracterizada por una sintomatología multiorgánica, fundamentalmente con patologías cardíacas y neurológicas, de las que aún hoy se desconoce con exactitud el mecanismo molecular subyacente. Se ha detectado una reducción de la actividad y de los niveles de proteína de los complejos de la cadena transportadora de electrones y una acumulación de ROS en muestras procedentes de pacientes con la enfermedad (de Keyzer et al. 2009; Gallego-Villar et al. 2013; Schwab et al. 2006; Yano et al. 2003), por lo que la disfunción mitocondrial secundaria al defecto y la alteración de la homeostasis redox podrían jugar un papel importante en el desarrollo de estas complicaciones. Estudios previos realizados en el laboratorio en el modelo murino de AP de 20 semanas de edad mostraron que estos parámetros están potencialmente alterados en diferentes tejidos relevantes para la fisiopatología de la enfermedad (Gallego-Villar 2015). Para completar este análisis, y corroborar la hipótesis de que estas vías contribuyen al desarrollo de la sintomatología característica de la AP, se decidió evaluar la función mitocondrial y la homeostasis redox en el modelo murino de la enfermedad a las 40 semanas de edad. El modelo murino utilizado para los estudios es el ratón hipomorfo *Pcca*^{-/-}(A138T) (Guenzel et al. 2013), cedido en colaboración con el grupo de Michael A. Barry (Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA), modelo que mimetiza la sintomatología clínica y bioquímica de los pacientes con la enfermedad.

2.1. Evaluación de la función mitocondrial

Como se ha mencionado, la función mitocondrial puede verse comprometida en AP debido a la acumulación tóxica de propionil-CoA y de metabolitos derivados que actúan como inhibidores de diferentes enzimas mitocondriales (Schwab et al. 2006). De este modo, se procedió al estudio de esta vía a través del análisis de proteínas implicadas en el metabolismo energético, de la actividad de los complejos de la CTE y de la depleción de mtDNA, marcadores del correcto funcionamiento de dicho orgánulo.

2.1.1. Análisis cuantitativo de proteínas del metabolismo energético

Para el análisis de proteínas del metabolismo energético se realizó un array de proteínas en fase reversa o RPPma (*Reverse Phase Protein microarray*, ProteomAb), llevado a cabo por el grupo de José M. Cuezva (CBMSO, Madrid, España), en el que se analizaron los niveles de proteínas que participan en procesos biológicos asociados a la mitocondria tales como la glicolisis (GAPDH y

LDHA), la fosforilación oxidativa (NDUFS3, SDHB, CORE2, COXII, β -F1 e IF1), la defensa antioxidante (CAT y SOD), otros procesos metabólicos como la vía de las pentosas fosfato (G6PDH) y la descarboxilación del piruvato (PDHe), y la dinámica (DLP1 y OPA1) y estructura mitocondrial (HSP60). El estudio se llevó a cabo en cerebro, corazón, hígado y músculo de ratones *wild-type* y *Pcca*^{-/-}(A138T) de 40 semanas de edad.

Todos los tejidos analizados exhibieron, en mayor o menor medida, una disminución de la cantidad de proteína de diferentes marcadores mitocondriales en los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) respecto de los *wild-type* (**Figura 11A**). Las muestras de cerebro presentaron una reducción de los niveles de GAPDH, de diferentes componentes de la cadena de transporte de electrones (COXII, β -F1 e IF1) y del enzima antioxidante CAT. En el corazón se detectó una disminución de los niveles de β -F1 y de G6PDH y un incremento de GAPDH, SOD2 y OPA1. Esta proteína, esencial para el mantenimiento de la morfología mitocondrial, se encontró también aumentada en el hígado de los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T), tejido en el que solo se detectó un descenso de los niveles del enzima CAT. Al igual que en los estudios previos en ratones de 20 semanas de edad (Gallego-Villar 2015), fue el músculo el tejido en el que la mayor parte de los marcadores analizados presentaron una disminución significativa de los niveles de proteína, entre ellos todos los componentes de la cadena transportadora de electrones (NDUFS3, SDHB, CORE2, COXII, β -F1 e IF1), SOD2, G6PDH y DLP1. Además, se calculó la firma bioenergética de cada tejido que viene dada por las razones β -F1/HSP60, β -F1/GAPDH y β -F1/LDHA (Aldea et al. 2011; Santacatterina et al. 2015) (**Figura 11B**). Las tres razones se encontraron disminuidas en el corazón y el músculo de los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T), mientras que el cerebro y el hígado no mostraron diferencias.

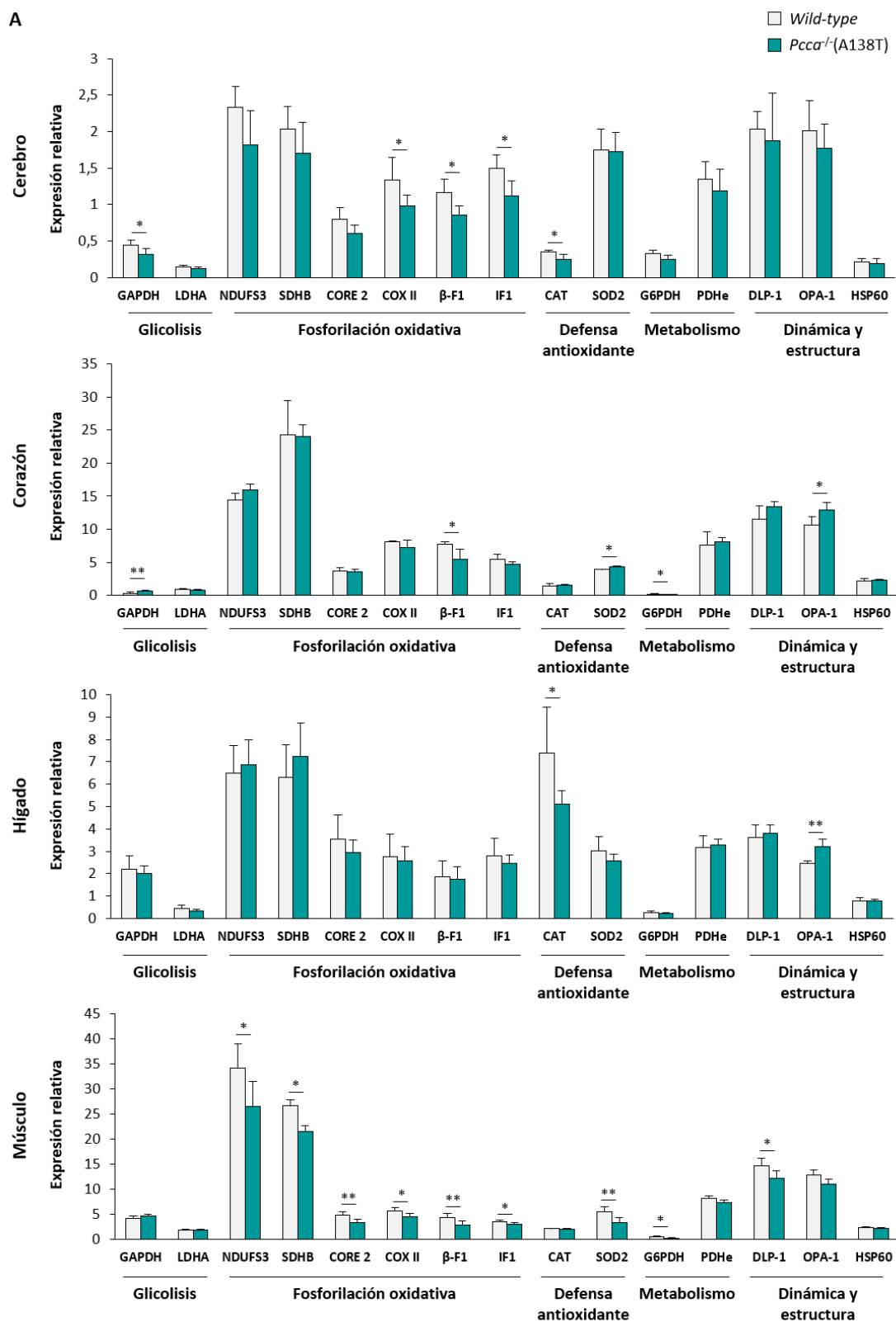


Figura 11. Análisis cuantitativo de proteínas del metabolismo energético. (Pie de figura en la página siguiente)

(Página anterior)

Figura 11. Análisis cuantitativo de proteínas del metabolismo energético. Se realizó un array de proteínas en fase reversa (RPPma) para determinar la firma bioenergética de cerebro, corazón, hígado y músculo de ratones *wild-type* y *Pcca*^{-/-}(A138T) de 40 semanas. **A)** Cada histograma representa el promedio de los nanogramos de proteína respecto de β -actina y la desviación estándar de $n = 4$ *wild-type* y $n = 6$ *Pcca*^{-/-}(A138T). **B)** Firma bioenergética evaluada por las razones β -F1/HSP60, β -F1/GAPDH y β -F1/LDHA. Análisis estadístico t de Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

2.1.2. Análisis de la actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones

En biopsias cardíacas, musculares, hepáticas y renales procedentes de pacientes con AP se ha detectado un déficit en la actividad de diferentes complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (de Keyzer et al. 2009; Schwab et al. 2006). Por este motivo, se decidió determinar la actividad de los complejos de la CTE en el modelo murino de AP. Estudios previos en el laboratorio mostraron una disminución significativa de la actividad del complejo CI en el corazón y del complejo CIII en el músculo de ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) de 20 semanas de edad (Gallego-Villar 2015). Para completar el análisis, en este trabajo se cuantificó la actividad de los complejos de la cadena respiratoria en el cerebro y el hígado de los ratones *wild-type* y *Pcca*^{-/-}(A138T) de 20 semanas de edad. Las medidas fueron realizadas por el grupo de Miguel Ángel Martín (Hospital 12 de octubre, Madrid, España).

La determinación de las actividades de los complejos CI, CII, CII+III, CI+CIII, CIII y CIV y de citrato sintasa (CS) reveló un aumento significativo de CII (18%) y una reducción de CI+CIII (26%) y CIII (13%) en el cerebro (Figura 12A), mientras que CII (7%), CII+CIII (29,6%), CIII (89%) y CS (62,8%) se encontraron significativamente incrementados en el hígado de los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) respecto de los *wild-type* (Figura 12B).

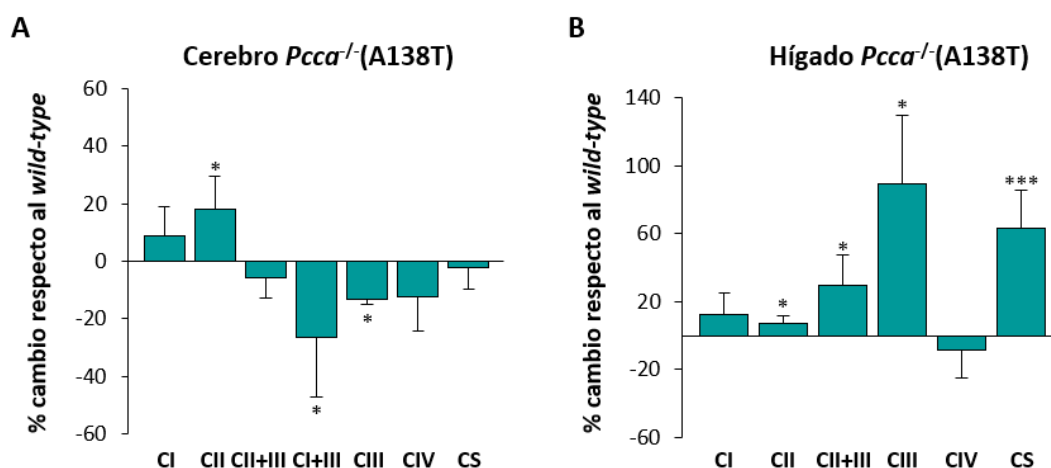


Figura 12. Análisis de la actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones. Medida de la actividad de los complejos CI, CII, CII+III, CI+CIII, CIII y CIV y de la citrato sintasa (CS) en el cerebro (panel A) y el hígado (panel B) de ratones *wild-type* y *Pcca*^{-/-}(A138T) de 20 semanas. La actividad de cada complejo se normalizó respecto de la actividad citrato sintasa. Cada histograma representa la media y la desviación estándar del porcentaje de cambio de los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) ($n = 5$) respecto de los *wild-type* ($n = 5$). Análisis estadístico t de Student (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

2.1.3. Análisis del contenido de DNA mitocondrial

Entre las enzimas inhibidas por el propionato se encuentra la succinil-CoA sintetasa (Brock et al. 2004). Pacientes con una marcada reducción de la actividad succinil-CoA sintetasa, debido a mutaciones en *SUCLA2* que codifica la subunidad β del enzima, presentan depleción de mtDNA (Elpeleg et al. 2005). Así, la depleción de mtDNA detectada en biopsias de tejido muscular de pacientes con AP (Yano et al. 2003) podría explicarse por dicho efecto inhibitorio. Para confirmar estas observaciones se decidió analizar el contenido de mtDNA en el cerebro, el corazón, el hígado y el músculo del modelo murino de AP de 40 semanas de edad. Como puede observarse en la **figura 13**, se detectó una disminución significativa del contenido de mtDNA en todos los tejidos analizados, exceptuando en el hígado.

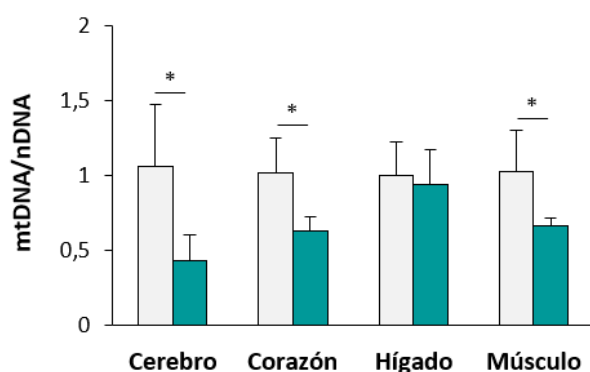


Figura 13. Evaluación del contenido de DNA mitocondrial. La depleción de DNA mitocondrial se analizó por qPCR en el cerebro, el corazón, el hígado y el músculo de ratones *wild-type* y *Pcca*^{-/-} (A138T) de 40 semanas. La cuantificación relativa se llevó a cabo aplicando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la razón mtDNA/nDNA (*ARBP/bf1*) de $n = 4$ *wild-type* y $n = 4$ *Pcca*^{-/-} (A138T). Análisis estadístico t de Student (* $p < 0,05$).

2.2. Evaluación de la homeostasis redox

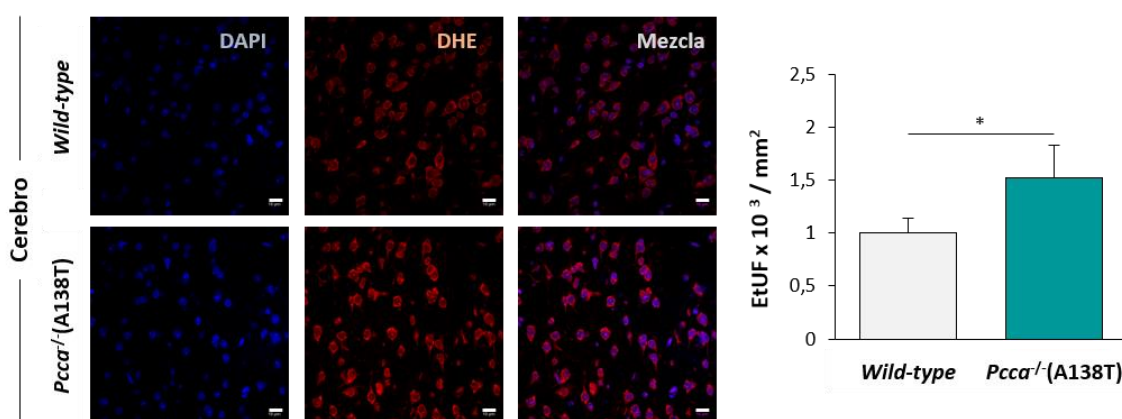
La mitocondria es una de las principales fuentes de ROS (Mailloux et al. 2013). Los complejos de la cadena respiratoria producen pequeñas cantidades de $O_2^{\cdot -}$ durante el proceso de reducción del O_2 en H_2O , a lo que también contribuyen otras enzimas de localización mitocondrial que, además, generan H_2O_2 (Larosa et al. 2018). Defectos genéticos que afectan directamente la función de la cadena respiratoria o la integridad de los complejos que forman parte de ésta, como el complejo CI (Sharma et al. 2011), provocan una producción exacerbada de ROS y, por tanto, una acumulación de daño oxidativo en proteínas, lípidos y DNA. Ya que se ha detectado un aumento de ROS (de Keyser et al. 2009; Gallego-Villar et al. 2013) y de marcadores de daño oxidativo (Mc Guire et al. 2009) en muestras de pacientes con AP, se decidió profundizar en la potencial contribución de la alteración de la homeostasis redox en la fisiopatología de la enfermedad a través del análisis de la producción de ROS y del daño que éstos generan en proteínas, lípidos y DNA.

2.2.1. Análisis de la producción de ROS: determinación de los niveles de radical superóxido y de peróxido de hidrógeno

Para evaluar la producción de ROS se analizaron los niveles de dos de las principales especies reactivas de oxígeno generadas por el organismo: $O_2^{\bullet-}$ y el H_2O_2 .

La detección de $O_2^{\bullet-}$ se llevó a cabo mediante el empleo de la sonda DHE en cortes histológicos de cerebro y corazón de ratones *wild-type* y *Pcca*^{-/-}(A138T) de 40 semanas de edad. Estos dos tejidos poseen una elevada demanda energética y, como consecuencia, tienden a producir altas cantidades de ROS. Tal y como se recoge en la **figura 14**, la fluorescencia en rojo detectada en el núcleo de las células, debido a la oxidación del DHE en etidio por el radical superóxido, es mayor en el cerebro de los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) respecto de los *wild-type*. En el corazón no se observaron diferencias significativas.

A



B

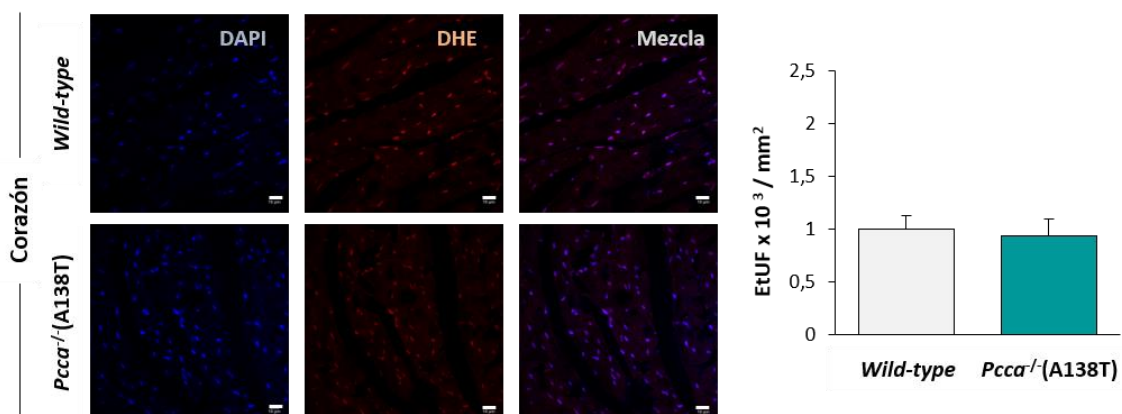


Figura 14. Determinación de los niveles intracelulares de $O_2^{\bullet-}$. Detección de $O_2^{\bullet-}$ empleando la sonda DHE en cortes histológicos de cerebro (**panel A**) y de corazón (**panel B**) de ratones *wild-type* y *Pcca*^{-/-}(A138T) de 40 semanas. El análisis se llevó a cabo mediante la cuantificación de la intensidad de fluorescencia relativa del etidio (EtUF). Los histogramas representan el promedio y la desviación estándar de las EtUF de 10 cortes de cada *wild-type* (n = 4) y *Pcca*^{-/-}(A138T) (n = 4). Análisis estadístico t de Student (*p<0,05). Barra de escala = 10 μ m.

Además, y con el fin de tener una mayor evidencia de la producción exacerbada de ROS, se decidió analizar los niveles de H_2O_2 *in vivo* mediante el empleo de la sonda MitoB. MitoB es una sonda que, tras su administración sistémica, se acumula en la mitocondria donde puede ser oxidada por el H_2O_2 en MitoP (Cocheme et al. 2012). Así, la razón MitoP/MitoB refleja los niveles de H_2O_2 *in vivo*. Dado que MitoB se distribuye fundamentalmente en el hígado, el corazón y el riñón (Logan et al. 2014), se cuantificó la presencia de H_2O_2 en el corazón y el hígado de ratones *wild-type* y *Pcca*^{-/-}(A138T) de 40 semanas de edad. Los resultados reflejan un aumento de la razón MitoP/MitoB en el hígado de los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) respecto de los *wild-type* (Figura 15). Al igual que en el caso del $O_2^{\bullet-}$, no se observaron diferencias significativas de la razón MitoP/MitoB en el corazón de estos ratones.

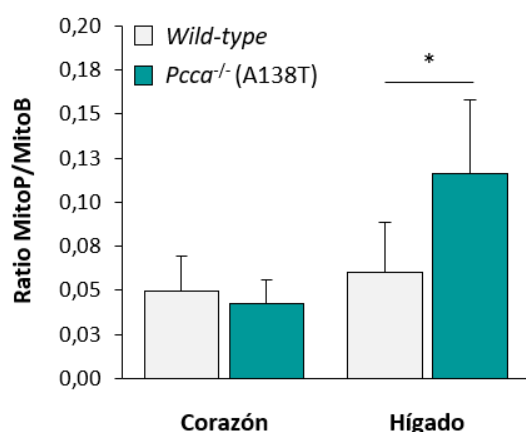


Figura 15. Análisis *in vivo* de los niveles de H_2O_2 mitocondrial. Determinación de los niveles de H_2O_2 mediante el empleo de la sonda MitoB en el corazón y el hígado de ratones *wild-type* y *Pcca*^{-/-}(A138T) de 40 semanas. El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la razón MitoP/MitoB de n = 5 *wild-type* y n = 5 *Pcca*^{-/-}(A138T). Análisis estadístico t de Student (*p<0,05).

2.2.2. Análisis del daño oxidativo a proteínas, lípidos y DNA

Se ha descrito que el daño oxidativo a proteínas, lípidos y DNA contribuye al desarrollo de diferentes patologías humanas, entre ellas las EMH (Olsen et al. 2015). Así, y tras comprobar que especialmente el cerebro y el hígado del modelo murino de AP presentan niveles aumentados de determinadas ROS, se decidió evaluar el impacto que éstas podrían tener en proteínas, lípidos y DNA.

Las ROS median un tipo de oxidación sobre las proteínas conocida como carbonilación. La carbonilación es un proceso en el que las cadenas laterales de diferentes aminoácidos, especialmente de lisina, arginina, prolina y treonina, son oxidadas formándose cetonas y aldehídos que pueden reaccionar con la 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) para formar productos proteicos detectables (Suzuki et al. 2010). Así, se utilizó el kit *OxyBlot protein oxidation detection kit*, basado en el empleo de DNPH, para la inmunodetección de dichos productos derivatizados como medida de la carbonilación de proteínas en el cerebro, el corazón, el hígado y el músculo de ratones *wild-type* y *Pcca*^{-/-}(A138T) de 40 semanas de edad.

El análisis de la intensidad de cada carril reveló que no había diferencias significativas en el contenido total de proteínas carboniladas entre ratones *wild-type* y *Pcca*^{-/-}(A138T) en ninguno de los tejidos analizados (**Figura 16**).

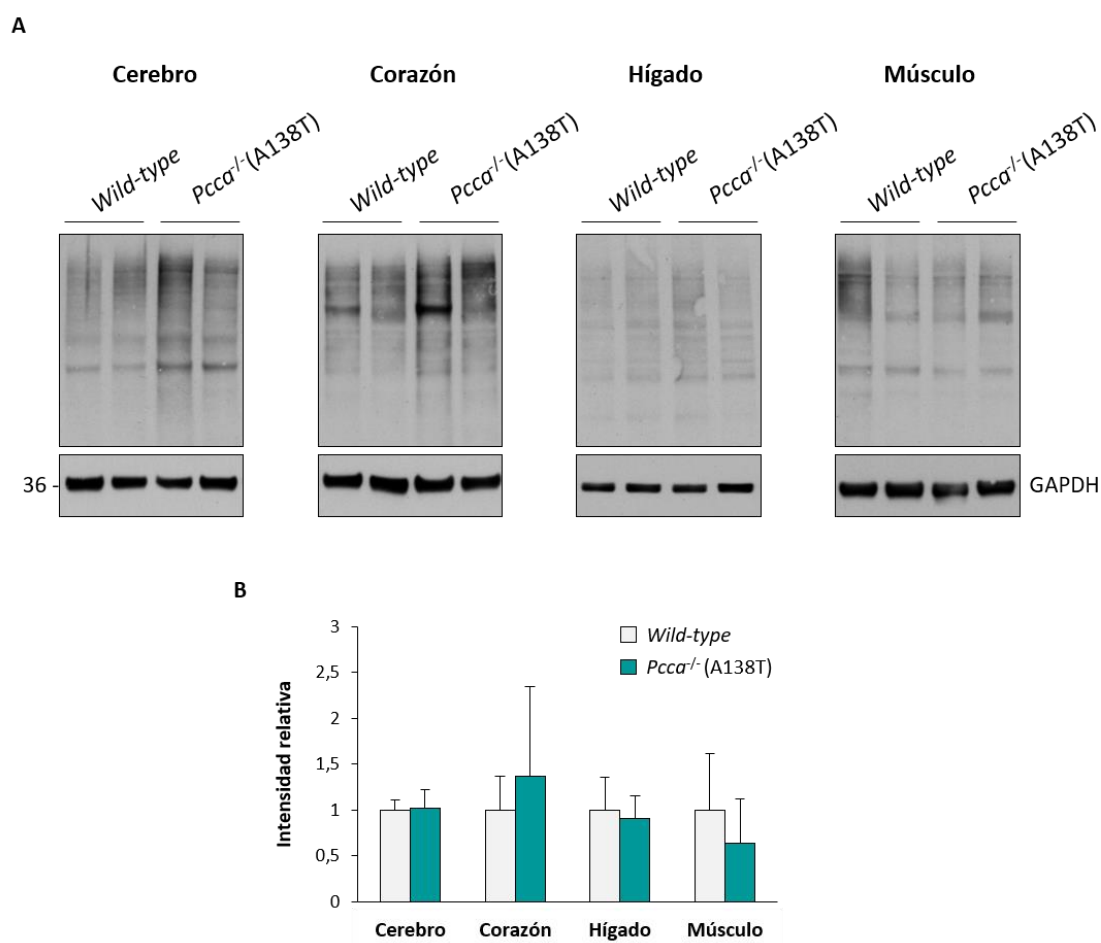


Figura 16. Evaluación del daño oxidativo a proteínas. A) Western blot representativo para la detección de proteínas carboniladas en el cerebro, el corazón, el hígado y el músculo de ratones *wild-type* y *Pcca*^{-/-}(A138T) de 40 semanas. GAPDH se utilizó como control de carga. **B)** Histograma que recoge el promedio y la desviación estándar de la intensidad relativa de cada carril de n = 4 *wild-type* y n = 5 *Pcca*^{-/-}(A138T).

Además de a proteínas, las ROS también median la oxidación de lípidos, especialmente poliinsaturados, en un proceso conocido como peroxidación lipídica y que se caracteriza por la formación de grupos aldehído como el malondialdehído (MDA) (Ayala et al. 2014). Los niveles de peroxidación lipídica fueron analizados en el cerebro, el corazón, el hígado y el músculo de ratones *wild-type* y *Pcca*^{-/-}(A138T) de 40 semanas de edad mediante el ensayo TBARS, que permite la detección de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico, fundamentalmente MDA. Los resultados mostraron un incremento significativo de MDA en el cerebro, el hígado y el músculo de los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) respecto de los *wild-type*, no así en el corazón donde no se detectaron diferencias significativas (**Figura 17A**).

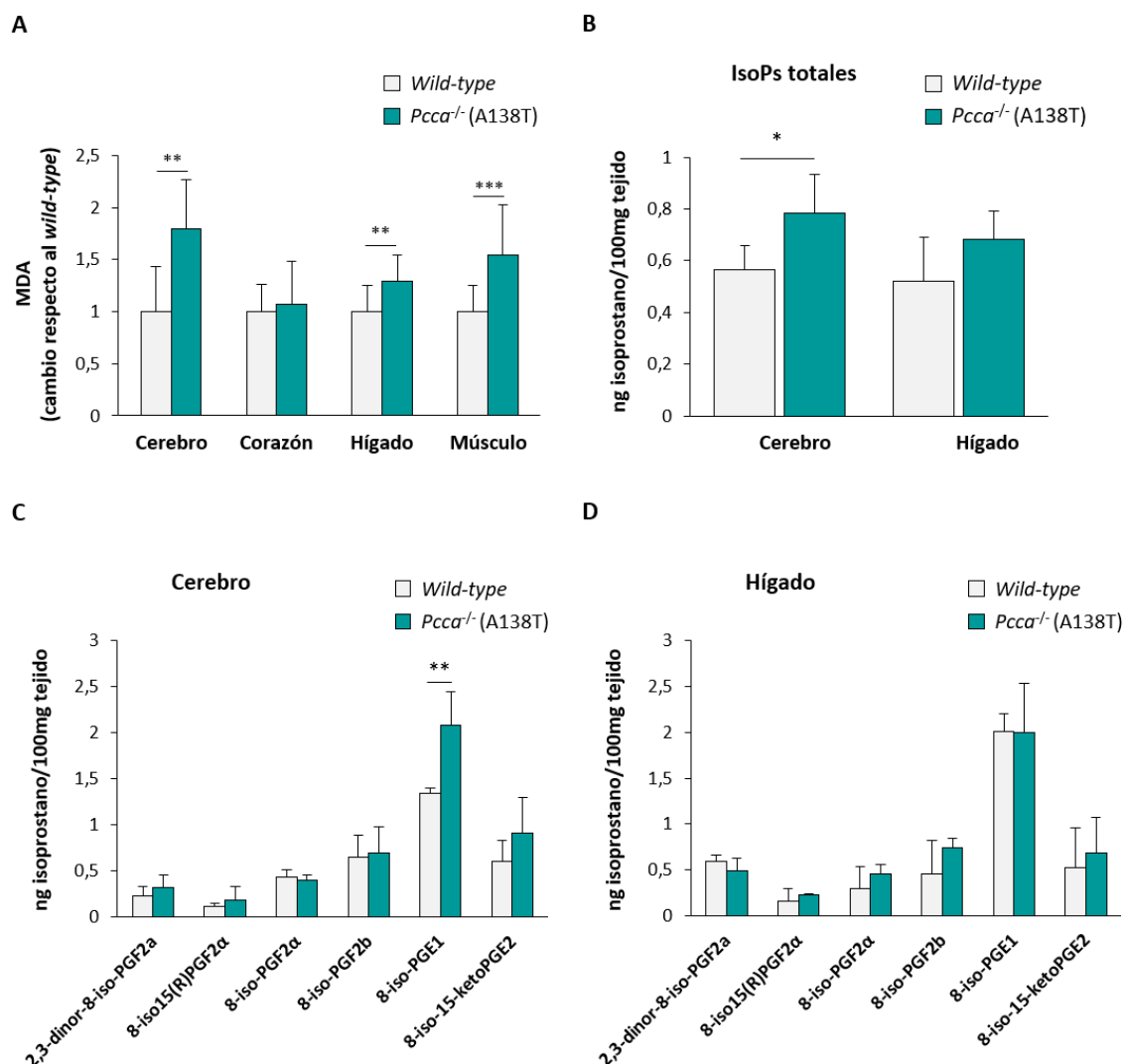


Figura 17. Evaluación del daño oxidativo a lípidos. Análisis del contenido de MDA en el cerebro, el corazón, el hígado y el músculo de ratones *wild-type* (n = 6) y *Pcca*^{-/-}(A138T) (n = 6) de 40 semanas (**panel A**) y determinación por UHPLC-MS/MS de los niveles relativos de isoprostanos totales (**panel B**) e individuales (**panel C y D**) en el cerebro y el hígado de ratones *wild-type* (n = 6) y *Pcca*^{-/-}(A138T) (n = 6) de 40 semanas. Cada histograma recoge la media y la desviación estándar de los datos. Análisis estadístico t de Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

En los últimos tiempos se han desarrollado nuevas estrategias que permiten medir de manera más específica la peroxidación lipídica. Una de ellas, descrita en (Medina et al. 2012a; Medina et al. 2012b), se basa en el empleo de UHPLC-MS/MS para la detección de diferentes isoprostanos como marcadores de daño oxidativo a lípidos. La aplicación de esta técnica, llevada a cabo en el laboratorio de A. Gil-Izquierdo, en muestras de cerebro e hígado de ratones *wild-type* y *Pcca*^{-/-}(A138T) de 40 semanas de edad permitió detectar seis de los marcadores estudiados. En conjunto, los niveles de isoprostanos se encontraron significativamente aumentados en el cerebro de los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) respecto de los *wild-type*, mientras que en el hígado el incremento no llegó a ser significativo (p = 0,09) (**Figura 17B**). De manera individual (**Figura 17C y 17D**), solo 8-iso-PGE₁ se detectó significativamente aumentado en el cerebro de los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T).

Finalmente, las ROS también pueden inducir daño en el DNA. La modificación que se genera comúnmente bajo situaciones de estrés es el 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxo-dG), cuya reparación está mediada por el enzima 8-oxo-guanina DNA glicosilasa 1 (OGG1). La acumulación de daño oxidativo en el DNA induce la expresión de OGG1, por lo que los niveles de proteína de este enzima pueden utilizarse como marcadores (Powell et al. 2005). Estudios previos en el laboratorio mostraron una alteración de los niveles de OGG1 solamente en el hígado de los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) de 20 semanas. Por este motivo, el análisis de OGG1 en ratones de 40 semanas de edad se llevó a cabo en este tejido, donde se observó un incremento significativo de los niveles de OGG1 en el hígado de los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) respecto de los *wild-type* (Figura 18).

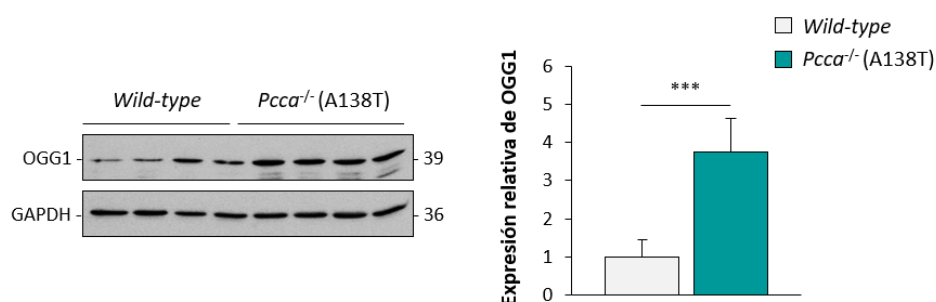


Figura 18. Evaluación del daño oxidativo a DNA. Western blot para la detección de OGG1 en el hígado de ratones *wild-type* (n = 4) y *Pcca*^{-/-}(A138T) (n = 5) de 40 semanas. GAPDH se utilizó como control de carga. El histograma recoge la media y la desviación estándar de la intensidad relativa de cada banda. Análisis estadístico t de Student (**p<0,001).

2.3. Evaluación de parámetros relacionados con la muerte celular

Con el fin de determinar si el daño oxidativo acumulado en los diferentes tejidos del modelo murino de AP podría estar promoviendo la muerte celular se decidió analizar la potencial activación del proceso de apoptosis determinando los niveles de la caspasa-3 (CASP3). Los resultados de la inmunodetección revelaron un incremento significativo de los niveles de CASP3 total en el cerebro y el corazón de los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) respecto de los *wild-type* (Figura 19A) de 40 semanas de edad. Aunque la apoptosis es el más estudiado, existen otros mecanismos para promover la muerte celular. Uno de ellos es la necrosis, proceso iniciado por perturbaciones intracelulares como el estrés oxidativo que induce la sobreexpresión de ciclofilina D (CYPD) (Lopez-Erauskin et al. 2012), uno de los componentes esenciales del poro de transición mitocondrial (mPTP). Así, se decidió analizar los niveles de CYPD para evaluar si el daño oxidativo podría estar promoviendo la muerte celular en el modelo murino de AP a través de este mecanismo. Mientras que en el cerebro y el corazón no se observaron diferencias significativas, los niveles de CYPD en el hígado de los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) de 40 semanas de edad se encontraron significativamente aumentados respecto de los *wild-type* (Figura 19B).

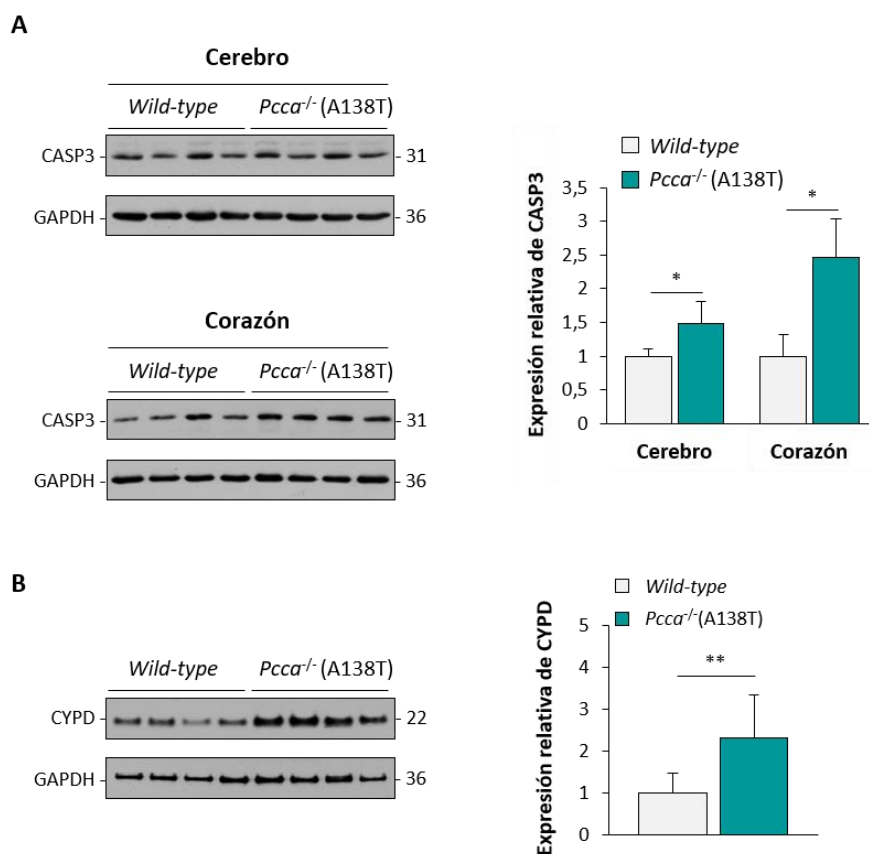


Figura 19. Evaluación de parámetros relacionados con la apoptosis y la necrosis celular. A) Western blot para la detección de CASP3 en el cerebro y el corazón de ratones *wild-type* (n = 4) y *Pcca*^{-/-}(A138T) (n = 4) de 40 semanas. **B)** Western blot para la detección de CYPD en el hígado de ratones *wild-type* (n = 4) y *Pcca*^{-/-}(A138T) (n = 4) de 40 semanas. GAPDH se utilizó como control de carga. Los histogramas recogen la media y la desviación estándar de la intensidad relativa de cada banda. Análisis estadístico t de Student (*p<0,05; **p<0,01).

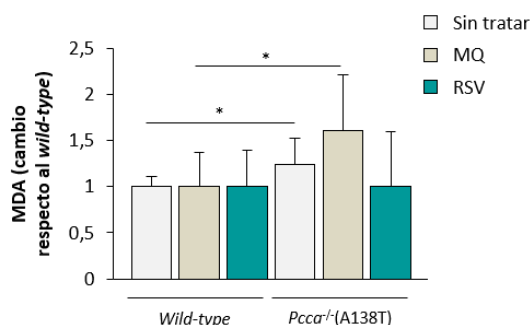
3. Efecto del tratamiento con MitoQ y resveratrol en el modelo murino de acidemia propiónica

Estudios previos demostraron la eficacia de siete antioxidantes en la reducción de los niveles de ROS en fibroblastos de pacientes con AP (Gallego-Villar et al. 2014). Por este motivo, se decidió investigar si el tratamiento con dos de estos compuestos, MitoQ y resveratrol, podría utilizarse *in vivo* como terapia adyuvante en AP con el fin de remitir las alteraciones observadas en la homeostasis redox. Para el estudio, se dividieron aleatoriamente ratones *wild-type* y *Pcca*^{-/-} (A138T) de 28 semanas de edad en los siguientes grupos: no tratados, tratados con MitoQ y tratados con resveratrol. El efecto sobre la homeostasis redox del tratamiento con MitoQ y resveratrol se llevó a cabo a través del análisis del daño oxidativo a lípidos y DNA, de los niveles de enzimas antioxidantes, del marcador de muerte celular CYPD y de los niveles de BNP como indicador de disfunción cardíaca.

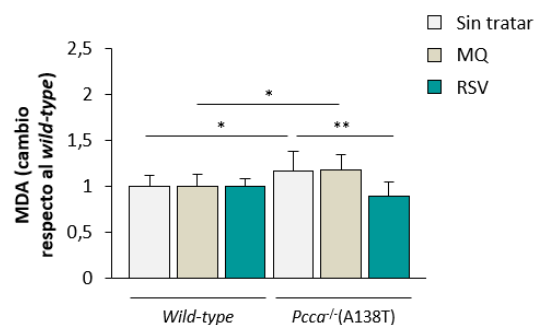
3.1. Análisis del daño oxidativo a lípidos y DNA

Los niveles de peroxidación lipídica se analizaron mediante el ensayo TBARS en el cerebro, el corazón y el hígado de ratones *wild-type* y *Pcca*^{-/-} (A138T) sin tratar y tratados con MitoQ o con resveratrol.

A) Cerebro



B) Corazón



C) Hígado

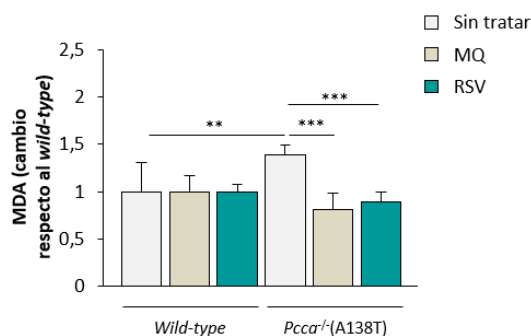


Figura 20. Efecto del tratamiento con MitoQ y resveratrol sobre la peroxidación lipídica. Detección del contenido de MDA en el cerebro (**panel A**), el corazón (**panel B**) y el hígado (**panel C**) de ratones sin tratar [*wild-type* (n=12) y *Pcca*^{-/-} (A138T) (n=11)], tratados con MitoQ [MQ, *wild-type* (n=12) y *Pcca*^{-/-} (A138T) (n=11)] y tratados con resveratrol [RSV, *wild-type* (n=10) y *Pcca*^{-/-} (A138T) (n=11)]. Cada histograma recoge la media y la desviación estándar de los datos. Análisis estadístico ANOVA seguido de Tukey's HSD o Games Howell post hoc test (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Como puede observarse en la **figura 20**, los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) sin tratar presentaron un mayor contenido de MDA en el cerebro, el corazón y el hígado con respecto de los *wild-type*, tal y como se ha descrito previamente (**Figura 17A**). El tratamiento con MitoQ redujo de manera significativa los niveles de peroxidación lipídica en el hígado (**Figura 20C**). El resveratrol, además de en el hígado, fue capaz de disminuir el daño oxidativo a lípidos en el corazón de los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) (**Figura 20B y 20C**).

El análisis del daño oxidativo a DNA se llevó a cabo a través de la inmunodetección de OGG1, cuyos niveles se habían encontrado significativamente aumentados en el hígado de los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) respecto de los *wild-type* de 40 semanas de edad (**Figura 18**). Tanto el tratamiento con MitoQ como con resveratrol promovió una reducción significativa de niveles de proteína OGG1 en el hígado de los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) respecto de los sin tratar (**Figura 21**), reflejo de que ambos compuestos disminuyen el daño oxidativo mediado por las ROS en el DNA.

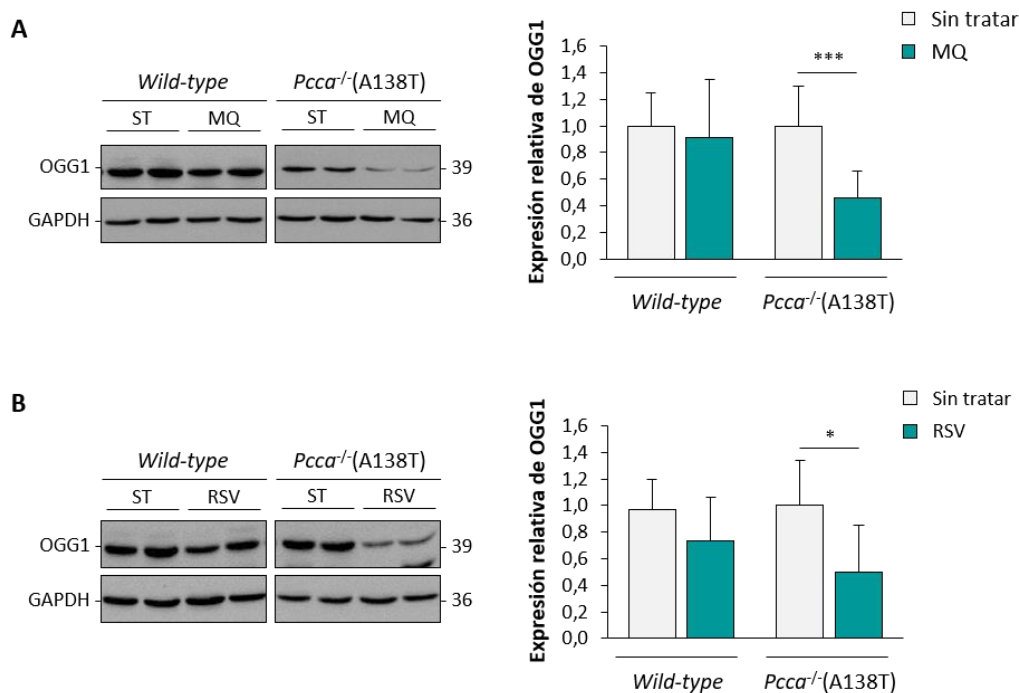


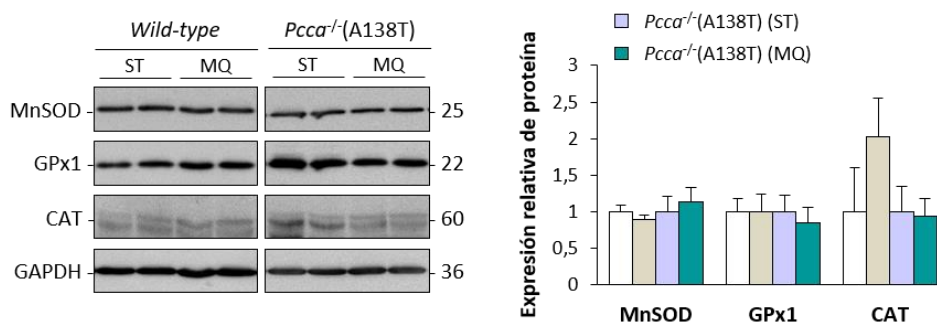
Figura 21. Efecto del tratamiento con MitoQ y resveratrol sobre el daño oxidativo en el DNA. Western blot representativo para la detección de OGG1 en el hígado de ratones sin tratar [ST, *wild-type* (n=12) y *Pcca*^{-/-}(A138T) (n=11)], tratados con MitoQ [MQ, *wild-type* (n=12) y *Pcca*^{-/-}(A138T) (n=11)] (**panel A**) y tratados con resveratrol [RSV, *wild-type* (n=10) y *Pcca*^{-/-}(A138T) (n=11)] (**panel B**). GAPDH se utilizó como control de carga. Cada histograma recoge la media y la desviación estándar de la intensidad relativa de cada banda. Análisis estadístico t de Student (*p<0,05; ***p<0,001).

3.2. Análisis de los niveles de enzimas antioxidantes

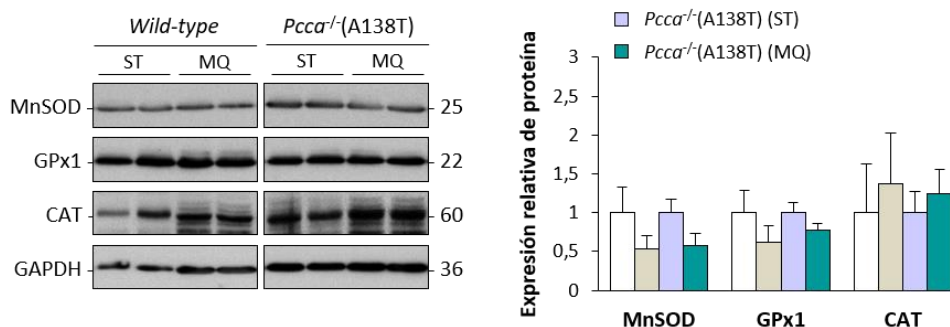
La reducción del daño oxidativo a lípidos y DNA en el modelo murino de AP podría explicarse como una disminución de ROS mediada por los antioxidantes MitoQ y resveratrol. Sin embargo,

hoy parece claro que *in vivo* este tipo de compuestos no actúan directamente sobre las ROS, sino que proporcionan protección tisular de manera indirecta (Forman et al. 2014; Schmidt et al. 2015). Los antioxidantes activan los factores de transcripción NRF2 y SIRT1 que median la respuesta antioxidante promoviendo la expresión, entre otros, de las enzimas antioxidantes. Por este motivo, se decidió monitorizar los niveles de MnSOD, GPx1 y CAT en ratones *wild-type* y *Pcca*^{-/-}(A138T) sin tratar y tratados con MitoQ o resveratrol (Figuras 22 y 23).

A) Cerebro



B) Corazón



C) Hígado

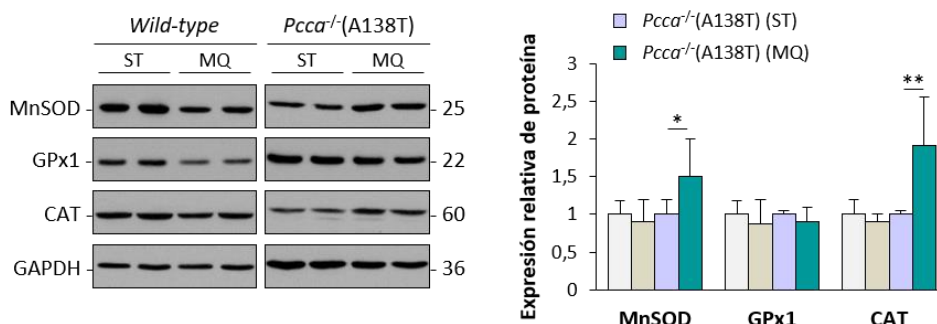
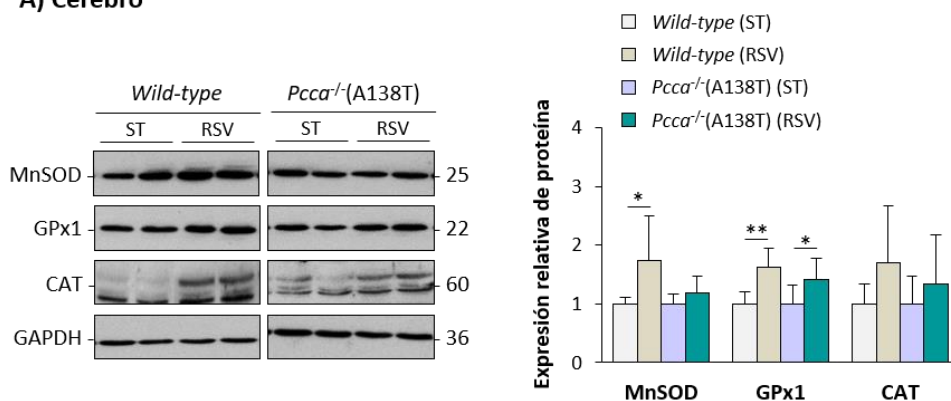


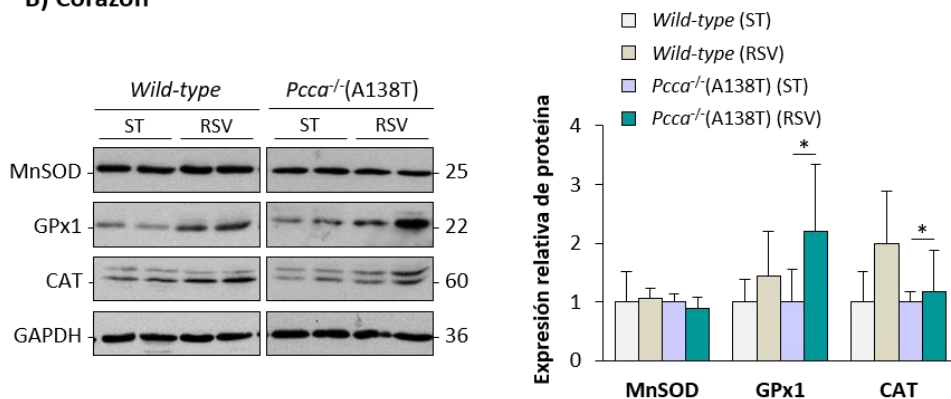
Figura 22. Efecto del tratamiento con MitoQ sobre los niveles de enzimas antioxidantes. Western blot representativo para la detección de MnSOD, GPx1 y CAT en el cerebro (panel A), el corazón (panel B) y el hígado (panel C) de ratones sin tratar [ST, *wild-type* (n=12) y *Pcca*^{-/-}(A138T) (n=11)] y tratados con MitoQ [MQ, *wild-type* (n=12) y *Pcca*^{-/-}(A138T) (n=11)]. GAPDH se utilizó como control de carga. Cada histograma recoge la media y la desviación estándar de los datos. Análisis estadístico t de Student (*p<0,05; **p<0,01).

Los niveles de MnSOD y CAT aumentaron en el hígado de los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) tratados con MitoQ (**Figura 22C**), mientras que en el cerebro y el corazón no se observaron diferencias significativas (**Figura 22A y 22B**). El tratamiento con resveratrol incrementó GPx1 en el cerebro y el corazón (**Figura 23A y 23B**) y CAT en el corazón y el hígado de los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) respecto de los individuos sin tratar (**Figura 23B y 23C**).

A) Cerebro



B) Corazón



C) Hígado

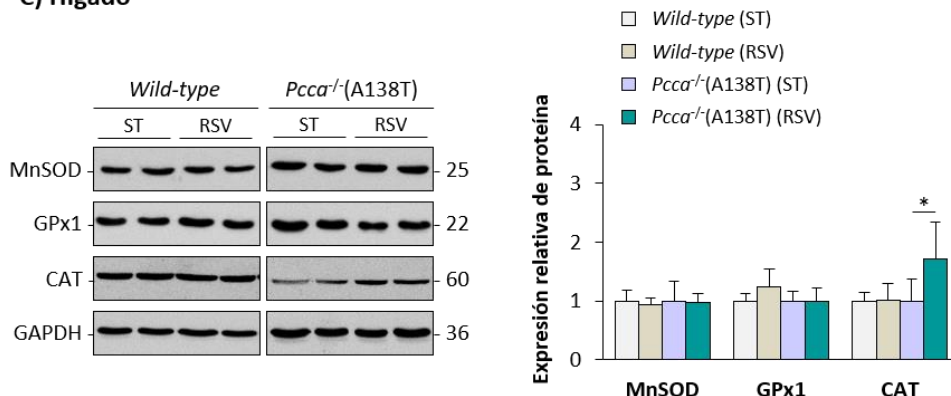


Figura 23. Efecto del tratamiento con resveratrol sobre los niveles de enzimas antioxidantes. Western blot representativo para la detección de MnSOD, GPx1 y CAT en el cerebro (**panel A**), el corazón (**panel B**) y el hígado (**panel C**) de ratones sin tratar [ST, *wild-type* (n=12) y *Pcca*^{-/-}(A138T) (n=11)] y tratados con resveratrol [RSV, *wild-type* (n=10) y *Pcca*^{-/-}(A138T) (n=11)]. GAPDH se utilizó como control de carga. Cada histograma recoge la media y la desviación estándar de la intensidad relativa de cada banda. Análisis estadístico t de Student (*p<0,05; **p<0,01).

3.3. Análisis del marcador de muerte celular CYPD

En situaciones patológicas se ha observado que el aumento de CYPD puede revertirse mediante el empleo de compuestos antioxidantes (Lopez-Erauskin et al. 2012). Ya que en el hígado del modelo murino de AP detectamos un incremento de CYPD (**Figura 19B**), se decidió analizar la posible disminución de los niveles de esta proteína tras el tratamiento con MitoQ y resveratrol. Como puede observarse en la **figura 24**, el tratamiento con resveratrol redujo de manera significativa los niveles de CYPD en los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) respecto de los sin tratar (**Figura 24A**). Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas en los niveles de CYPD hepáticos entre ratones sin tratar y tratados con MitoQ (**Figura 24B**).

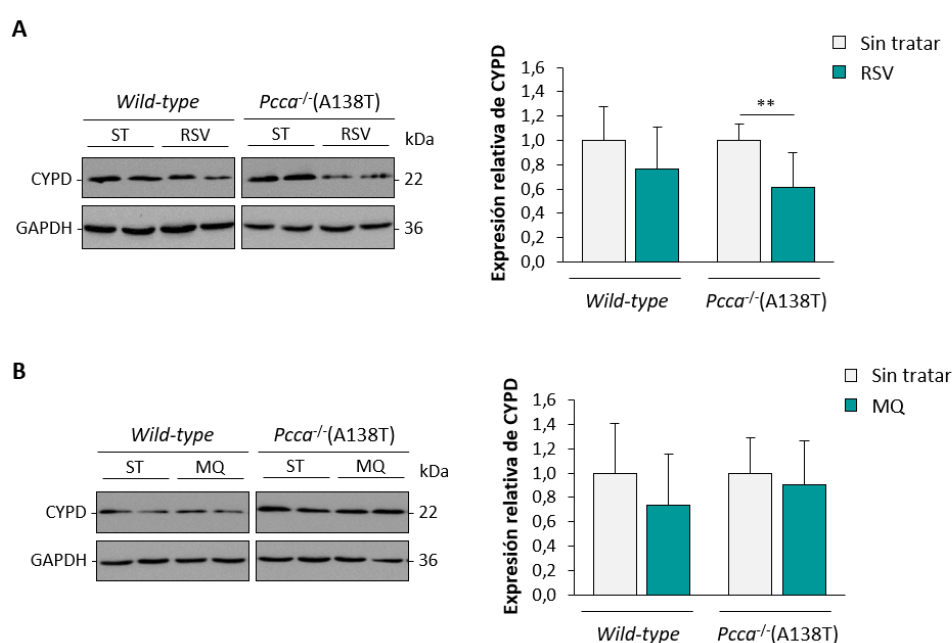


Figura 24. Efecto del tratamiento con MitoQ y resveratrol sobre la muerte celular por necrosis. Western blot representativo para la detección de CYPD en hígado de ratones sin tratar [ST, *wild-type* (n=12) y *Pcca*^{-/-}(A138T) (n=11)], tratados con resveratrol [RSV, *wild-type* (n=10) y *Pcca*^{-/-}(A138T) (n=11)] (**panel A**) y tratados con MitoQ [MQ, *wild-type* (n=12) y *Pcca*^{-/-}(A138T) (n=11)] (**panel B**). GAPDH se utilizó como control de carga. Cada histograma recoge la media y la desviación estándar de la intensidad relativa de cada banda. Análisis estadístico t de Student (**p<0,01).

3.4. Análisis del marcador de daño cardíaco BNP

Las complicaciones cardíacas, fundamentalmente la cardiomiopatía dilatada y las arritmias, son frecuentes en pacientes con AP (Grunert et al. 2013; Pena et al. 2012b). En el modelo murino de la enfermedad se ha descrito un incremento de la expresión de *Nppb* (Brain Natriuretic Peptide o BNP), marcador de daño cardíaco, así como un aumento del tamaño del corazón (Guenzel et al. 2013). El tratamiento con MitoQ y resveratrol ha permitido aliviar de manera eficaz determinadas complicaciones cardíacas en diferentes modelos de enfermedad (Chan et al. 2008; Graham et al. 2009), por este motivo, se decidió investigar si el uso de estos compuestos podría revertir la disfunción cardíaca que desarrolla el modelo murino de AP.

Como medida para evaluar la función cardíaca se analizó por qRT-PCR la expresión de *Nppb* en el corazón de los ratones *wild-type* y *Pcca*^{-/-}(A138T) sin tratar y tratados con MitoQ y resveratrol. Según lo descrito (Guenzel et al. 2013), se encontró un incremento significativo de los niveles de *Nppb* en los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) respecto de los *wild-type* sin tratar (Figura 25). Tanto el tratamiento con MitoQ como con resveratrol redujo significativamente la expresión de *Nppb* en el modelo murino de AP (Figura 25).

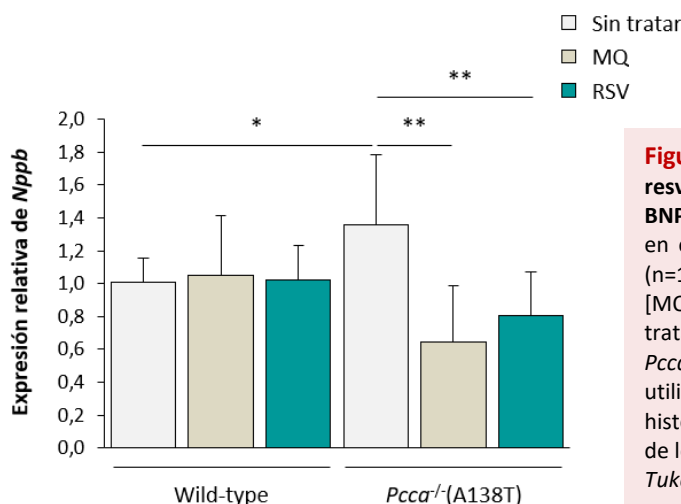


Figura 25. Efecto del tratamiento con MitoQ y resveratrol sobre el marcador de daño cardíaco BNP. Análisis por qRT-PCR de la expresión de *Nppb* en el corazón de ratones sin tratar [ST, *wild-type* (n=12) y *Pcca*^{-/-}(A138T) (n=11)], tratados con MitoQ [MQ, *wild-type* (n=12) y *Pcca*^{-/-}(A138T) (n=11)] y tratados con resveratrol [RSV, *wild-type* (n=10) y *Pcca*^{-/-}(A138T) (n=11)]. Los datos se normalizaron utilizando *Gapdh* como gen endógeno. El histograma recoge la media y la desviación estándar de los datos. Análisis estadístico ANOVA seguido de Tukey's HSD (*p<0,05; **p<0,01).

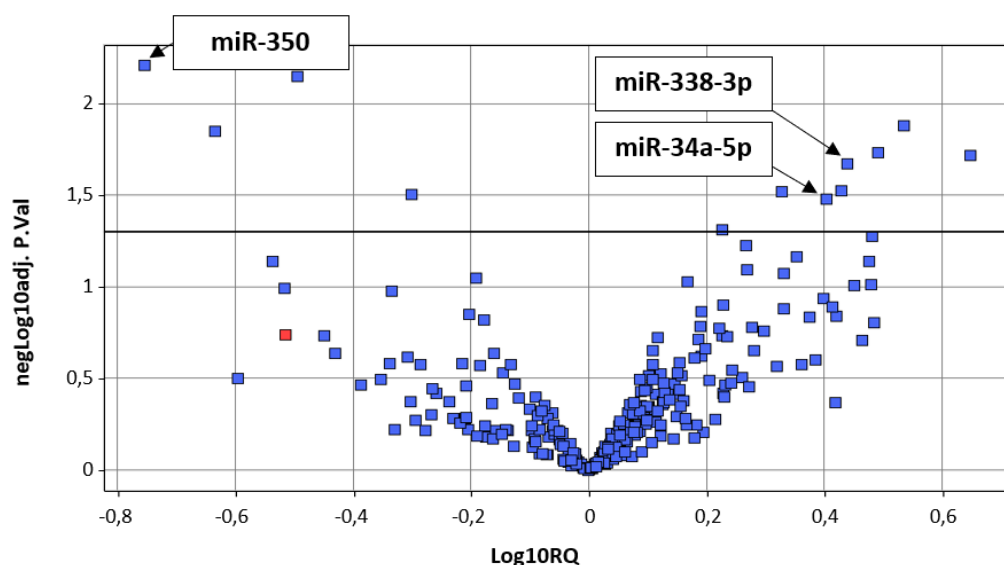
4. Identificación y caracterización de miRNAs desregulados en el modelo murino de acidemia propiónica

En los últimos tiempos los miRNAs han cobrado gran relevancia en el contexto patológico puesto que controlan multitud de procesos biológicos tales como la función mitocondrial, la homeostasis redox y la muerte celular (Bu et al. 2017; Geiger et al. 2017; Su et al. 2015). Por tanto, su desregulación tiene un gran impacto en la fisiología celular y se ha asociado al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, cardíacas y cáncer (Cao et al. 2016; Di Leva et al. 2014; Wang et al. 2016b). Por este motivo, se decidió investigar la posible implicación de los miRNAs en la fisiopatología de la AP. Así, se realizó un perfil de miRNAs en el hígado del modelo murino de la enfermedad de 8 semanas de edad con el fin de identificar la presencia de miRNAs desregulados. Además, se analizó la expresión, no solo hepática sino también cerebral y cardíaca, de aquellos miRNAs que podrían ser más relevantes para la patología. Finalmente, se evaluó la expresión de miRNAs específicos o enriquecidos en el cerebro y que, por tanto, podrían jugar un papel importante en el desarrollo de la sintomatología neurológica característica de los pacientes con AP (Nizon et al. 2013; Schreiber et al. 2012).

4.1. Perfil hepático de miRNAs

La identificación de miRNAs desregulados en el modelo murino de AP se llevó a cabo en primer lugar en el hígado de ratones *wild-type* y *Pcca*^{-/-}(A138T) de 8 semanas de edad. Se seleccionó el hígado como punto de partida para estos estudios debido a que este órgano presenta los niveles de expresión más elevados de actividad PCC, es la principal diana para el tratamiento de la enfermedad (Quintero et al. 2018) y, además, los pacientes con AP presentan una alteración de la función hepática (Imbard et al. 2018). El análisis se llevó a cabo por qPCR utilizando un panel que contiene oligonucleótidos para la detección de 752 miRNAs murinos. Del total de miRNAs analizados, se detectaron 14 significativamente desregulados en los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) respecto de los *wild-type*: cuatro con una expresión menor y los diez restantes con niveles aumentados (**Figura 26**).

A



B

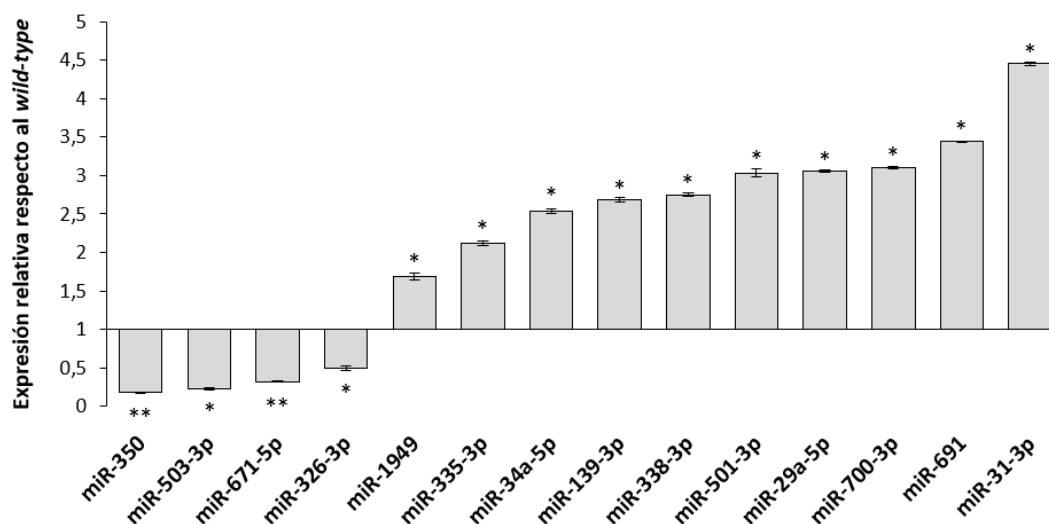


Figura 26. Identificación de miRNAs desregulados en el hígado del modelo murino de AP. Perfil hepático de miRNAs llevado a cabo por qPCR en un panel que contiene 752 oligonucleótidos para la detección de miRNAs de ratón y de rata en ratones *wild-type* (n = 4) y *Pcca*^{-/-}(A138T) (n = 4) de 8 semanas. La cantidad relativa de cada miRNA se calculó usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y los datos se normalizaron con U6 snRNA, RNU1A, RNU5G, miR-103-3p, miR-191-5p, miR-423-3p y Let-7c-5p. Análisis estadístico t de Student (*p<0,05; **p<0,01). **A)** Volcano plot mostrando los resultados del perfil de miRNAs. **B)** Histograma que recoge la media y la desviación estándar de la cantidad relativa de los miRNAs significativamente alterados.

A continuación, se realizó un análisis bioinformático, utilizando diferentes algoritmos (*miRBase*, y *MirTarBase* y *TargetScan*), y una búsqueda bibliográfica en Pubmed con el fin de determinar las potenciales dianas de los miRNAs, así como los procesos biológicos que regulan y que podrían ser relevantes en la fisiopatología de AP. Los resultados del análisis se recogieron en la **tabla 10**. Como puede observarse, se encontraron dianas validadas experimentalmente para 11 de los 14 miRNAs alterados en el hígado de los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T). La apoptosis, la proliferación celular y la

función mitocondrial se constituyeron como los procesos biológicos más representados. Para futuros estudios se seleccionaron miR-34a-5p, miR-338-3p y miR-350 como candidatos ya que, a través de la regulación post-transcripcional de la expresión de *Bcl2*, *Map2k1*, *Sirt1* (miR-34a-5p), *Atp5g1* (miR-338-3p) y *p38* y *Jnk* (miR-350), controlan procesos biológicos tales como la función mitocondrial, la homeostasis redox y la muerte celular, potencialmente alterados en AP (de Keyzer et al. 2009; Gallego-Villar et al. 2013; Schwab et al. 2006). Además, los tres miRNAs se han encontrado desregulados en enfermedades neurodegenerativas (De Felice et al. 2014; Reynolds et al. 2018; Sarkar et al. 2016) y cardiomiopatías (Boon et al. 2013; Ge et al. 2013), por lo que miR-34a-5p, miR-338-3p y miR-350 podrían también contribuir al desarrollo de la sintomatología neurológica y cardíaca de la AP.

Tabla 10. miRNAs desregulados en el hígado del modelo murino de AP

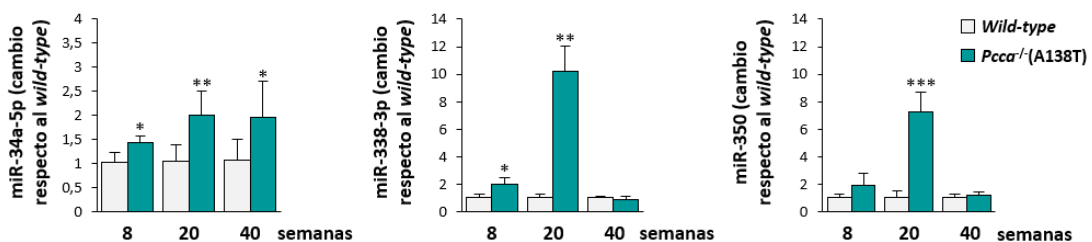
miRNA	RQ	Dianas validadas ¹	Proceso biológico	Enfermedad
miR-31-3p	4,5	<i>RhoA</i>	Biomarcador de placenta	n.d.
miR-691	3,4	n.d.	n.d.	n.d.
miR-700-3p	3,1	n.d.	n.d.	n.d.
miR-29a-5p	3,1	<i>HDAC</i>	Proliferación celular, fibrosis	Cáncer, cardiomiopatía
miR-501-3p	3	<i>Gria1</i>	Neurotransmisión	n.d.
miR-338-3p*	2,7	<i>Aatk, Atp5g1, CoxIV</i>	Transmisión axonal, apoptosis, función mitocondrial	Cáncer, neurodegeneración
miR-139-3p	2,7	<i>MMP11</i>	Organización matriz extracelular	Cáncer
miR-34a-5p*	2,5	<i>Bcl2, Notch1, Map2k1, Sirt1</i>	Apoptosis, función mitocondrial, respuesta a estrés oxidativo	Cáncer, Alzheimer, cardiomiopatías
miR-335-3p	2,1	<i>PAX6</i>	Proliferación celular	Cáncer
miR-1949	1,7	<i>Rb1</i>	Control ciclo celular	Cáncer
miR-326-3p	0,5	<i>Bcl-xl, Notch1/2, PKM</i>	Apoptosis, proliferación celular, metabolismo	Cáncer
miR-671-5p	0,3	<i>Smadcb1</i>	Proliferación celular	Cáncer
miR-503-3p	0,2	n.d.	n.d.	n.d.
miR-350*	0,2	<i>p38, Jnk</i>	Apoptosis	Hipertrofia cardíaca

¹ Dianas validadas experimentalmente recogidas en MiRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>)
 En negrita se resaltan los miRNAs seleccionados como candidatos
 n.d. no hay datos

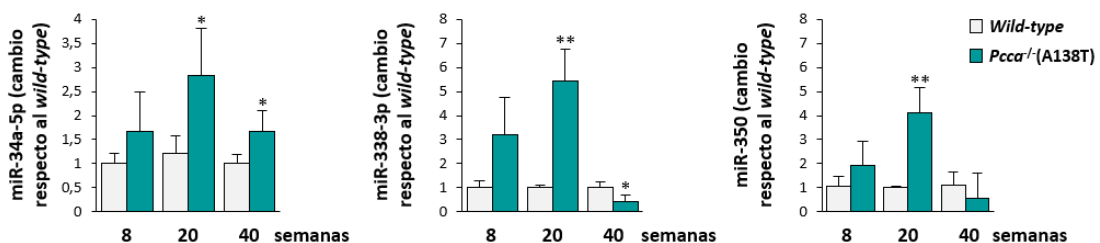
4.2. Análisis de la expresión de miR-34a-5p, miR-338-3p y miR-350

Para comprobar el posible papel de miR-34a-5p, miR-338-3p y miR-350 en la fisiopatología de la AP se analizó su expresión en el cerebro, el corazón y el hígado de ratones *wild-type* y *Pcca*^{-/-}(A138T) de 8, 20 y 40 semanas de edad. Como puede observarse en la **figura 27**, las mayores diferencias en la expresión de los tres miRNAs se detectaron en los ratones de 20 semanas, donde miR-34a-5p, miR-338-3p y miR-350 se encontraron significativamente aumentados en el cerebro y el corazón de los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) respecto de los *wild-type*. El análisis también reveló un aumento moderado de miR-34a-5p y miR-338-3p en estos dos tejidos en ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) de 8 y 40 semanas. Sin embargo, en el hígado solo se encontraron diferencias significativas en los niveles de los tres miRNAs en ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) de 8 semanas.

A) Cerebro



B) Corazón



C) Hígado

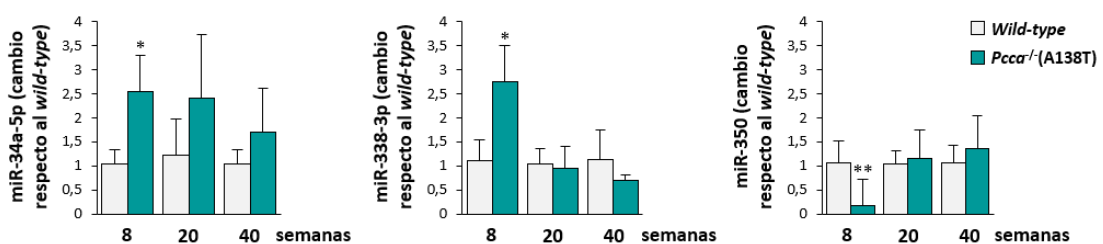
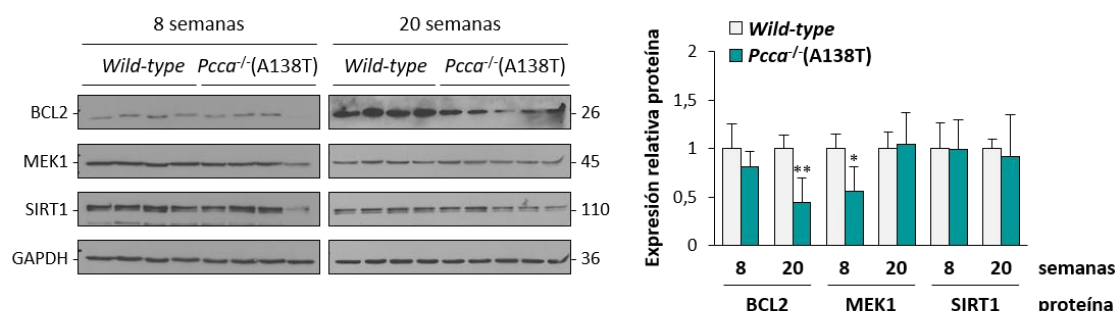


Figura 27. Identificación de miRNAs desregulados en el cerebro, el corazón y el hígado del modelo murino de AP. Análisis de la expresión de miR-34a-5p, miR-338-3p y miR-350 por qRT-PCR en el cerebro (**panel A**), el corazón (**panel B**) y el hígado (**panel C**) de ratones *wild-type* (n = 4-5) y *Pcca*^{-/-}(A138T) (n = 4-5) de 8, 20 y 40 semanas. La cantidad relativa de cada miRNA se calculó usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y los datos se normalizaron con U6 y miR-423-3p. Cada histograma recoge la media y la desviación estándar de los datos. Análisis estadístico t de Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

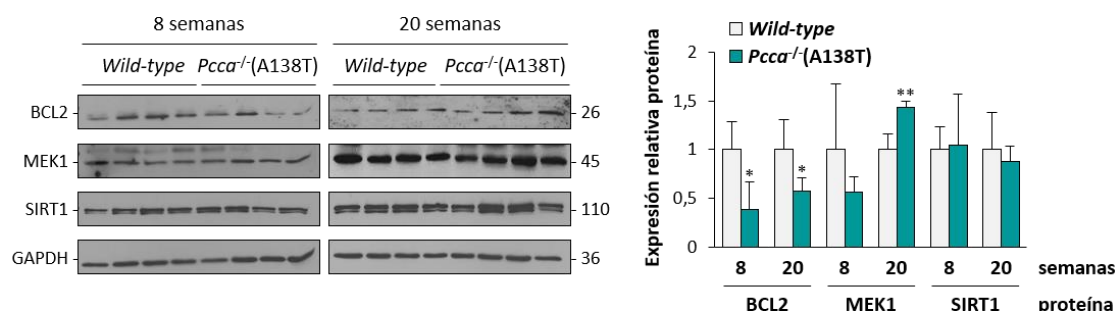
4.3. Análisis de las potenciales dianas de miR-34a-5p

Puesto que miR-34a-5p se encontró aumentado en el cerebro, el corazón y el hígado de los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T), se decidió estudiar la posible contribución de este miRNA a la fisiopatología de la AP a través del análisis de sus dianas. De entre las validadas experimentalmente (anotadas en la base de datos *MirTarBase*), se procedió a estudiar BCL2, MEK1 y SIRT1 debido a su implicación en la apoptosis, la respuesta a estrés oxidativo y/o en la función mitocondrial. Para ello, se analizaron por western blot los niveles de estas proteínas en ratones *wild-type* y *Pcca*^{-/-}(A138T) de 8 y 20 semanas (**Figura 28**). En el cerebro se encontró una disminución significativa de BCL2 y de MEK1 (**Figura 28A**) y en el corazón una reducción de BCL2 y un aumento de MEK1 (**Figura 28B**). En el hígado de los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) de 8 semanas se detectó una disminución de MEK1, sin embargo, en ratones de 20 semanas se encontró un aumento de MEK1 y de SIRT1 (**Figura 28C**).

A) Cerebro



B) Corazón



C) Hígado

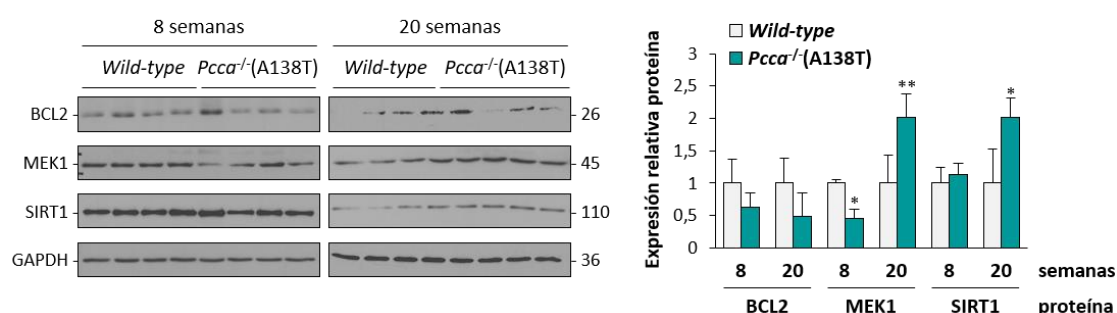


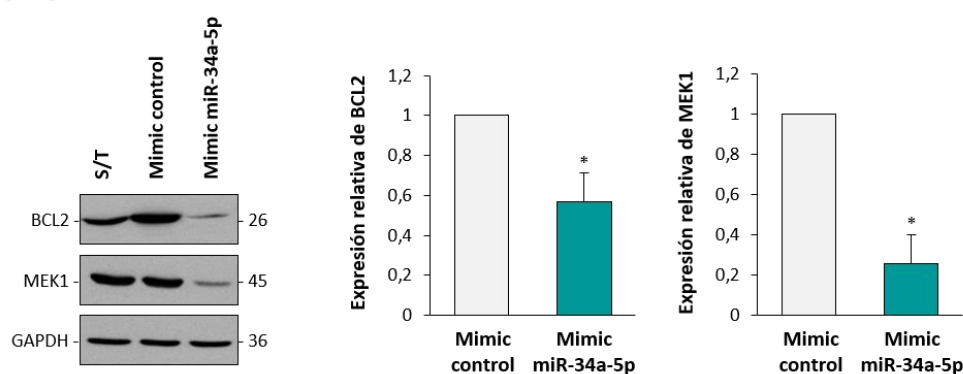
Figura 28. Evaluación de las potenciales dianas de miR-34a-5p en el modelo murino de AP. (Pie de figura en la página siguiente)

(Página anterior)

Figura 28. Evaluación de las potenciales dianas de miR-34a-5p en el modelo murino de AP. Western blot representativo para la detección de BCL2, MEK1 y SIRT1 en el cerebro (**panel A**), el corazón (**panel B**) y el hígado (**panel C**) de ratones *wild-type* (n = 4) y *Pcca*^{-/-}(A138T) (n = 4-5) de 8 y 20 semanas. GAPDH se utilizó como control de carga. Cada histograma recoge la media y la desviación estándar de la intensidad relativa de cada banda. Análisis estadístico t de Student (*p<0,05; **p<0,01).

Según los resultados obtenidos, BCL2 y MEK1 podrían ser dianas de miR-34a-5p en determinadas condiciones. Con el fin de proporcionar mayor evidencia sobre la regulación de estas dos proteínas por miR-34a-5p se decidió realizar un análisis funcional en hepatoma (Hep3B) y en una línea de fibroblastos transformados procedentes de un paciente con AP que contiene la mutación p.A138T en el gen *PCCA* (22742T) mediante la sobreexpresión e inhibición de miR-34a-5p. Los niveles de dicho miRNA se analizaron por qRT-PCR y los de BCL2 y de MEK1 por western blot. La sobreexpresión de miR-34a-5p, tanto en Hep3B como en la línea 22742T, supuso un descenso de los niveles de proteína de BCL2 y de MEK1 (**Figura 29**). No se observaron diferencias significativas tras la transfección de ambas líneas con el correspondiente inhibidor (datos no mostrados).

A) Hep3B



B) 22742T

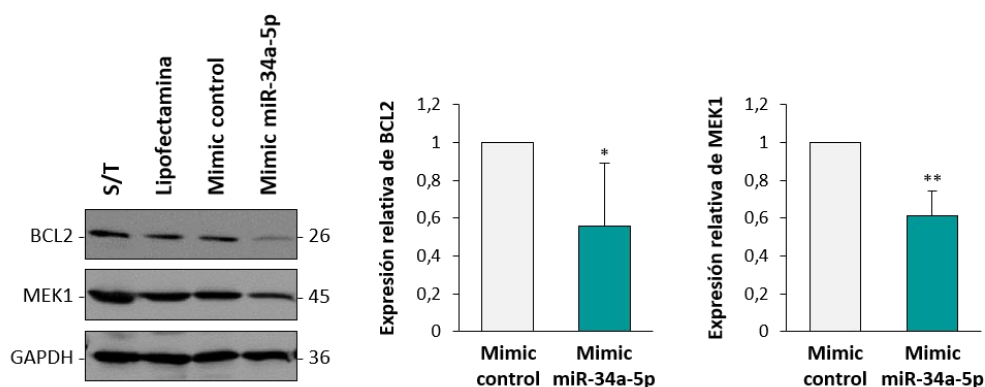


Figura 29. Análisis funcional de BCL2 y de MEK1 como dianas de miR-34a-5p. Western blot representativo de tres experimentos independientes para la detección de BCL2 y MEK1 en Hep3B (**panel A**) y 22742T (**panel B**) transfectadas o sin transfectar (S/T) con el mimic de miR-34a-5p y un mimic control. GAPDH se utilizó como control de carga. Cada histograma recoge la media y la desviación estándar de la intensidad relativa de cada banda. Análisis estadístico t de Student (*p<0,05; **p<0,01).

4.4. Análisis de la expresión de miRNAs específicos de cerebro

Una de las principales características de los miRNAs es que poseen una distribución específica de tejido. Se han descrito, entre otros, miRNAs que se expresan exclusivamente en el cerebro o que, al menos, se encuentran muy enriquecidos en este tejido (Sempere et al. 2004). Esta familia de miRNAs juega un papel muy importante en la fisiología cerebral y, de hecho, su desregulación contribuye al desarrollo de diferentes enfermedades neurológicas (Cao et al. 2016). Ya que los pacientes con AP presentan alteraciones neurológicas y que datos preliminares del laboratorio indican también una ligera disfunción locomotora en los ratones AP (Gallego-Villar 2015), se decidió analizar la expresión de miRNAs específicos de cerebro (miR-9-5p, miR-124-3p, miR-125b-5p, miR-128-3p, miR-132-3p, miR-138-5p y miR-146a-5p) con el fin de determinar su posible implicación en la enfermedad.

Para el estudio se realizó una retrotranscripción de dichos miRNAs y los cDNAs de ratones *wild-type* y *Pcca*^{-/-}(A138T) de 8 y 20 semanas de edad se organizaron en grupos para la posterior qPCR. Mientras que en ratones de 8 semanas no se apreciaron grandes diferencias en los niveles de los miRNAs analizados (**Figura 30A**), miR-124-3p, miR-128-3p, miR-138-5p y miR-146a-5p se encontraron aumentados en los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) respecto de los *wild-type* de 20 semanas (**Figura 30B**). Para confirmarlo, se analizaron los niveles de estos cuatro miRNAs en muestras individualizadas. Como puede observarse en la **figura 30C**, se detectó un incremento significativo de la expresión de miR-124-3p, miR-128-3p, miR-138-5p y miR-146a-5p en los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) respecto de los *wild-type* de 20 semanas.

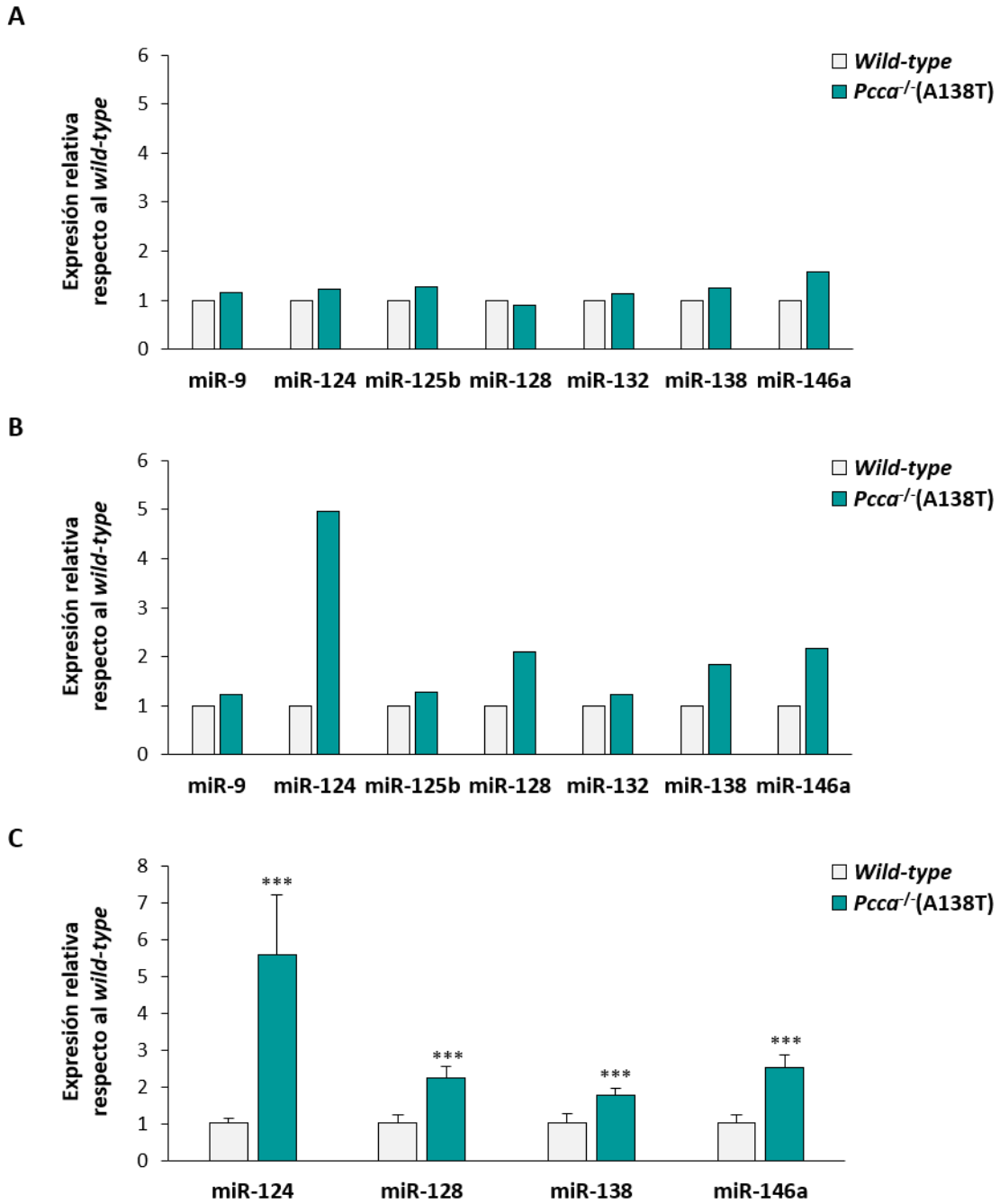
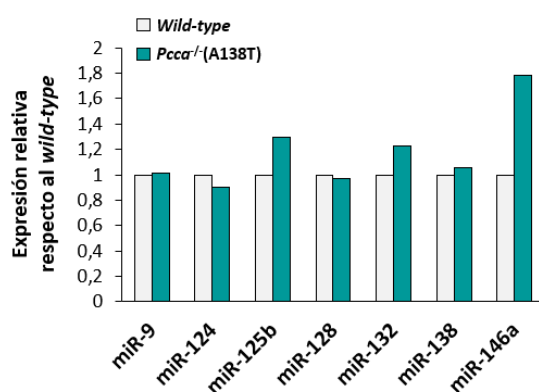


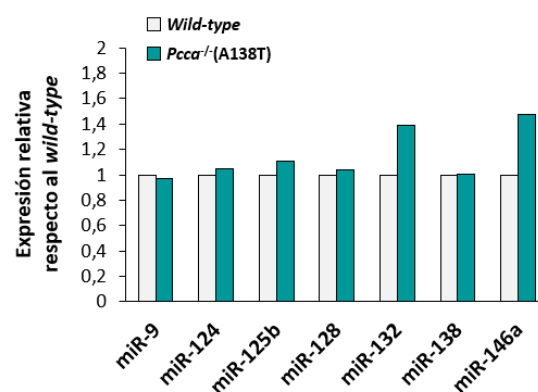
Figura 30. Identificación de miRNAs específicos de cerebro desregulados en el modelo murino de AP. Análisis de la expresión de miR-9-5p, miR-124-3p, miR-125b-5p, miR-128-3p, miR-132-3p, miR-138-5p y miR-146a-5p por qRT-PCR en muestras agrupadas del cerebro de ratones *wild-type* (n = 4-5) y *Pcca*^{-/-}(A138T) (n = 4-5) de 8 (**panel A**) y 20 (**panel B**) semanas. La expresión de miR-124-3p, miR-128-3p, miR-138-5p y miR-146a-5p se analizó por qRT-PCR en muestras individualizadas de cerebro de ratones *wild-type* (n = 5) y *Pcca*^{-/-}(A138T) (n = 5) de 20 semanas (**panel C**). La cantidad relativa de cada miRNA se calculó usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y los datos se normalizaron con U6 y miR-423-3p. Cada histograma recoge la media y la desviación estándar de los datos. Análisis estadístico t de Student (***) $p < 0,001$.

Los miRNAs, además de expresarse específicamente en el cerebro, también lo hacen de manera diferencial según la región de éste (Marcuzzo et al. 2015). Ya que los pacientes con AP presentan alteraciones en distintas regiones del cerebro, se decidió analizar la expresión de miR-9-5p, miR-124-3p, miR-125b-5p, miR-128-3p, miR-132-3p, miR-138-5p y miR-146a-5p por qRT-PCR en muestras agrupadas de estriado, hipocampo, corteza y cerebelo de ratones *wild-type* y *Pcca*^{-/-}(A138T) de 20 semanas. Aunque siendo preliminares, los resultados revelaron una diferente expresión de los miRNAs según la región del cerebro estudiada (**Figura 31**): en el estriado se encontró un incremento de miR-125b-5p y miR-146a-5p, en el hipocampo de miR-132-3p y miR-146a-5p, en la corteza un aumento de miR-9-5p y un descenso de miR-138-5p, mientras que en el cerebelo todos los miRNAs analizados se encontraron disminuidos en los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) respecto de los *wild-type* (**Figura 31D**).

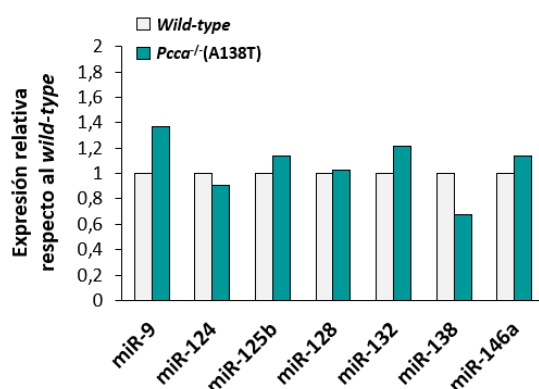
A) Estriado



B) Hipocampo



C) Corteza



D) Cerebelo

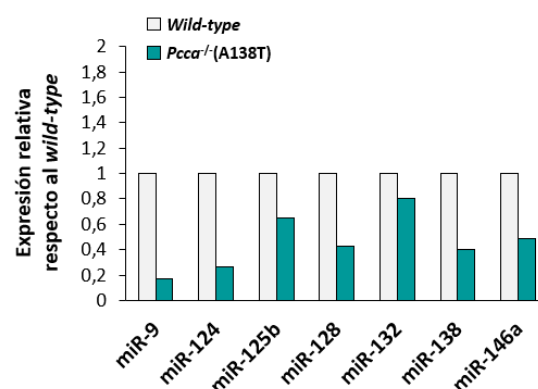


Figura 31. Identificación de miRNAs específicos de cerebro desregulados en distintas regiones del cerebro del modelo murino de AP. Análisis de la expresión de miR-9-5p, miR-124-3p, miR-125b-5p, miR-128-3p, miR-132-3p, miR-138-5p y miR-146a-5p por qRT-PCR en muestras agrupadas del estriado (**panel A**), el hipocampo (**panel B**), la corteza (**panel C**) y el cerebelo (**panel D**) de ratones *wild-type* (n = 5) y *Pcca*^{-/-}(A138T) (n = 5) de 20 semanas. La cantidad relativa de cada miRNA se calculó usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y los datos se normalizaron con U6 y miR-423-3p. Cada histograma recoge la media de los datos.

5. Identificación de miRNAs circulantes en acidemia propiónica

Recientemente se ha demostrado que los miRNAs son secretados selectivamente por los tejidos y que circulan de manera estable en varios fluidos corporales como plasma, orina y saliva (Chen et al. 2012). La existencia de perfiles diferentes de miRNAs plasmáticos entre individuos sanos y con alguna patología (Schwienbacher et al. 2017; Toro et al. 2018) ha permitido desarrollar en los últimos tiempos el uso de miRNAs como marcadores mínimamente invasivos de enfermedad, tanto para el diagnóstico como para la diferenciación de patologías con similar etiología, la predicción del pronóstico de una enfermedad, así como la monitorización de la respuesta a un tratamiento específico (De Guire et al. 2013). En AP existen excelentes marcadores para el diagnóstico, pero no para el seguimiento de la patología y la monitorización de la respuesta a un determinado tratamiento. Por ello, se decidió investigar los perfiles de miRNAs en el plasma del modelo murino y de pacientes con AP con el fin de definir posibles nuevos marcadores para la enfermedad.

5.1. Identificación de miRNAs alterados en el plasma del modelo murino

Como punto de partida de los estudios se determinaron los niveles de miR-34a-5p, miR-338-3p y miR-350 en el plasma del modelo murino de AP, donde estos miRNAs se habían encontrado previamente desregulados en el cerebro, el corazón y el hígado (Figura 27). El análisis se llevó a cabo por qRT-PCR en muestras plasmáticas procedentes de ratones *wild-type* y *Pcca*^{-/-}(A138T) de 20 y 40 semanas. Se detectó una disminución significativa de miR-34a-5p y de miR-350 en el plasma de los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) respecto de los *wild-type* de 40 semanas (Figura 32).

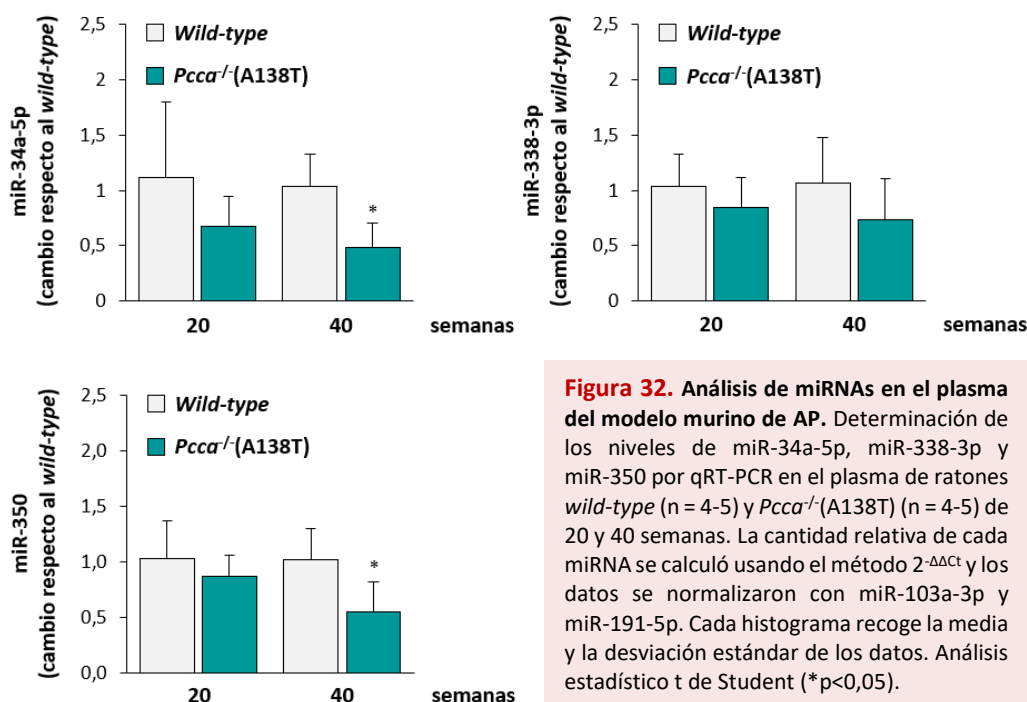


Figura 32. Análisis de miRNAs en el plasma del modelo murino de AP. Determinación de los niveles de miR-34a-5p, miR-338-3p y miR-350 por qRT-PCR en el plasma de ratones *wild-type* (n = 4-5) y *Pcca*^{-/-}(A138T) (n = 4-5) de 20 y 40 semanas. La cantidad relativa de cada miRNA se calculó usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y los datos se normalizaron con miR-103a-3p y miR-191-5p. Cada histograma recoge la media y la desviación estándar de los datos. Análisis estadístico t de Student (*p<0,05).

5.2. Identificación de miRNAs alterados en el plasma de pacientes

Se decidió entonces analizar el perfil de miRNAs en remanentes de muestras plasmáticas de individuos control y de pacientes con AP menores de un año (muchas de ellas muestras al diagnóstico). Las muestras de controles y de pacientes se distribuyeron en dos grupos, conteniendo cada uno de ellos muestras de cuatro o cinco individuos. El perfil se realizó utilizando un panel que contiene oligonucleótidos para la detección de 752 miRNAs humanos por qPCR. Un total de 352 miRNAs pudieron ser cuantificados, de los que 73 se encontraron desregulados con un cambio mayor o menor de 2 veces respecto de los controles: 33 aumentados y 40 disminuidos (**Tabla 11**). Además, y junto con el análisis bioinformático y la búsqueda bibliográfica en Pubmed para determinar las dianas validadas y los procesos biológicos que regulan, se utilizó la herramienta *Human miRNA Tissue Atlas* para identificar el tejido en el que se expresan dichos miRNAs. Los resultados revelaron que una gran proporción de éstos proceden del cerebro, el corazón y el músculo (**Tabla 11**).

Los resultados de este panel se compararon con los obtenidos en el hígado del modelo murino de AP, obteniéndose seis miRNAs comunes a ambos perfiles: miR-29a-5p, miR-31-3p, miR-34a-5p, miR-326, miR-335-3p y miR-338-3p. Cabe destacar que miR-34a-5p y miR-338-3p se encontraron también desregulados en el cerebro y el corazón de los ratones AP. Éstos junto con miR-29a-5p, cuyos niveles en pacientes presentan la mayor variación respecto de los controles, se seleccionaron como candidatos para los siguientes estudios. Así, se analizaron los niveles de miR-29a-5p, miR-34a-5p y miR-338-3p por qPCR en muestras individuales de plasma procedentes de individuos control y de pacientes con AP a diferentes edades: pacientes neonatales (menores de un mes) (n = 8 por grupo), pacientes de entre dos y diez años en seguimiento (n = 12 por grupo) y pacientes de 12 a 25 años en seguimiento (n = 8 por grupo). Como puede observarse en la **figura 33**, en los pacientes con AP menores de un mes solamente se detectó un incremento significativo de los niveles de miR-34a-5p, mientras que en los dos grupos de pacientes con AP de mayor edad los niveles de miR-29a-5p, miR-34a-5p y miR-338-3p se encontraron significativamente disminuidos respecto de los controles.

Tabla 11. Detección de miRNAs alterados en el plasma de pacientes con AP

miRNA	RQ	Expresión tisular	Proceso biológico	Enfermedad	Dianas
miR-519e-5p	51,7	Ubicuo	Biomarcador de placenta	n.d.	n.d.
miR-382-3p	39,9	Ubicuo	n.d.	Síndrome de Rett, déficit cognitivo medio	<i>SOD2, DRD1</i>
miR-31-5p	27,6	Tiroides, cerebro (cerebelo)	Apoptosis, proliferación, miogénesis	Cáncer, DMD, Alzheimer	<i>DMD, MAP4K4, NFAT5</i>
miR-34a-5p	96	Ubicuo	Apoptosis, función mitocondrial	Cáncer, hipertrofia cardíaca, enfermedad hepática	<i>BCL2, MAP2K1, NOTCH1, SIRT1</i>
miR-887-3p	6,2	Nódulos linfáticos, hígado	n.d.	Cáncer	n.d.
miR-125b-5p	5,5	Médula espinal, cerebro	Apoptosis, proliferación	Cáncer, Alzheimer	<i>BAK1, BCL2L2, MAPK1, TP53</i>
miR-206	5	Músculo	Apoptosis, metabolismo, proliferación	Cáncer, distrofia miotónica tipo I	<i>G6PD, HSP60, NOTCH3</i>
miR-143-3p	4,7	Esófago, vejiga	Metabolismo	Cáncer	<i>HK2</i>
miR-96-3p	4,5	n.d.	n.d.	Cáncer, cardiomiopatía, hipertrofia	n.d.
miR-132-3p	4,3	Cerebro	Apoptosis, función neuronal	Cáncer, Alzheimer, déficit cognitivo medio	<i>MAPK1, NOTCH1, SIRT1</i>
miR-126-5p	4,3	Bazo, músculo, miocardio	Proliferación	Cáncer, aterosclerosis	<i>DLK1</i>
miR-34a-3p	3,9	Ubicuo	Apoptosis, proliferación	Cáncer	<i>BCL2</i>
miR-320d	3,9	Hueso, cerebro (cerebelo)	n.d.	n.d.	n.d.
miR-10b-5p	3,9	Epidídimo	Apoptosis, metabolismo	Cáncer	<i>BCL2L11, PPARA</i>
miR-548a-3p	3,7	Músculo, tiroides	n.d.	Cáncer	n.d.
miR-320c	3,7	Ubicuo	n.d.	Cáncer	n.d.
miR-337-5p	3,4	Cerebro, hueso, músculo	n.d.	n.d.	n.d.
miR-126-3p	3,4	Tiroides, miocardio, músculo	Apoptosis, metabolismo	Cáncer, enfermedad cardíaca	<i>BCL2, SIRT1</i>
miR-31-3p	3,3	Tiroides, cerebro	n.d.	Cáncer	n.d.
miR-152-3p	3,2	Tiroides, músculo	n.d.	Cáncer	n.d.
miR-92b-3p	2,7	Ubicuo	n.d.	Cáncer	n.d.
miR-323a-3p	2,7	Cerebro, médula espinal	Metástasis	Cáncer	<i>SMAD2, SMAD3</i>
miR-548d-5p	2,6	Ubicuo	n.d.	Cáncer, esquizofrenia	<i>PPARA</i>
miR-543	2,5	Cerebro, músculo	Miogénesis	Cáncer	<i>TWIST1</i>
miR-181d-5p	2,5	Ubicuo	Apoptosis	Cáncer	<i>BCL2</i>
miR-320b	2,4	Ubicuo	n.d.	Cáncer	n.d.
miR-151a-3p	2,4	Ubicuo	Migración celular	Cáncer	<i>TWIST</i>
miR-30d-5p	2,4	Pulmón, músculo, miocardio	Autofagia, apoptosis	Cáncer, enfermedad cardíaca	<i>BECN1, CASP3</i>
miR-501-3p	2,1	Ubicuo	n.d.	Cáncer, Alzheimer	n.d.
miR-505-3p	2,1	Bazo, tiroides, hígado	n.d.	Cáncer	n.d.
miR-361-5p	2,1	Ubicuo (cerebro, músculo)	Proliferación	Cáncer	<i>VEGFA</i>
miR-199a-3p	2,1	Tiroides, piel, hueso	Metabolismo	Cáncer, enfermedad cardíaca	<i>MTOR</i>
miR-23b-3p	2	Epidídimo	Migración celular	Cáncer	<i>MET</i>
miR-29c-3p	0,7	Músculo, cerebro	Apoptosis	Cáncer, Alzheimer	<i>BCL2, COL1A1, COL1A2</i>
miR-598-3p	0,7	Cerebro, médula espinal	n.d.	n.d.	n.d.
miR-20b-5p	0,7	Tiroides, músculo	Proliferación, metabolismo	Cáncer	<i>HIF1A, PPARG</i>

miRNA	RQ	Expresión tisular	Proceso biológico	Enfermedad	Dianas validadas ¹
miR-107	0,5	Cerebro, médula espinal, tiroides	Proliferación, metabolismo lipídico	Cáncer, Alzheimer, derrame cerebral	<i>DICER1, HADHA, HIF1A, NOTCH2</i>
miR-2110	0,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
miR-363-3p	0,6	Tiroides, cerebro, músculo	Apoptosis, función cardíaca	Cáncer	<i>BCL2L11, CASP3, HAND1</i>
miR-345-5p	0,6	Ubicuo	Proliferación	Cáncer	<i>CDKN1A</i>
miR-24-2-5p	0,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
miR-1224-3p	0,6	Bazo, hígado	n.d.	n.d.	n.d.
miR-29a-3p	0,6	Músculo, cerebro	Apoptosis, fibrosis	Cáncer, fibrosis cardíaca, preeclampsia	<i>BCL2, COL4A1, MCL1</i>
miR-133a-3p	0,6	Músculo, miocardio	Reprogramación cardiomiocitos, fibrosis	Cáncer, hipertrofia cardíaca	<i>NFATC4</i>
miR-128-3p	0,6	Cerebro, médula espinal, músculo	Apoptosis, proliferación	Cáncer, Huntington, cognitive impairment	<i>TGFBR1</i>
miR-136-5p	0,5	Hueso, cerebro, músculo	Apoptosis, metabolismo	Cáncer	<i>BCL2, PPP2R2A</i>
miR-548b-3p	0,5	Ubicuo	n.d.	n.d.	n.d.
miR-33a-5p	0,5	Hueso, músculo, cerebro	Proliferación, metabolismo	Cáncer	<i>MYC, PPARA</i>
miR-30e-3p	0,5	Músculo, miocardio	Supervivencia	Cáncer, fallo cardíaco	<i>NFKBIA</i>
miR-22-3p	0,5	Músculo, miocardio	Apoptosis, función mitocondrial	Cáncer, enfermedad cardíaca, endometriosis	<i>HDAC4, PPARA, SIRT1</i>
miR-218-5p	0,4	Cerebro (cerebelo), médula espinal	Supervivencia, proliferación	Cáncer	<i>RICTOR</i>
miR-28-5p	0,4	Músculo, tiroides, miocardio	Apoptosis	Cáncer	<i>BAG1, NRF2</i>
miR-376a-5p	0,4	Ubicuo	n.d.	n.d.	n.d.
miR-378a-5p	0,4	Músculo, miocardio	Supervivencia, proliferación	Cáncer	<i>NODAL</i>
miR-200c-3p	0,4	Tiroides, skin	Proliferación, invasión	Cáncer	<i>ZEB1</i>
miR-98-5p	0,3	Tiroides, músculo, cerebro	Apoptosis	Cáncer	<i>CASP3</i>
miR-326	0,3	Ubicuo	Apoptosis, proliferación, metabolismo	Cáncer, esclerosis múltiple	<i>BCL2L1, NOTCH1, NOTCH2, PKM</i>
miR-96-5p	0,3	Epidídimo, tiroides, piel	Apoptosis, metabolismo	Cáncer	<i>FOXO1, FOXO3</i>
miR-335-3p	0,3	Músculo, bazo	Proliferación	Cáncer	<i>PAX6</i>
miR-99a-3p	0,2	Ubicuo	n.d.	n.d.	n.d.
miR-455-5p	0,2	Hueso, cerebro, médula espinal	n.d.	n.d.	n.d.
miR-766-3p	0,2	Ubicuo	n.d.	Cáncer	n.d.
miR-337-3p	0,2	Bazo, músculo, hígado	Metástasis	Cáncer	<i>MZF1</i>
miR-331-3p	0,2	Músculo, tiroides, cerebro	Apoptosis, proliferación	Cáncer	<i>HOTAIR, NRP2</i>
miR-338-3p	0,2	Cerebro, médula espinal	Apoptosis, función mitocondrial	Cáncer, ALS	<i>COX4I1, HIF1A, MAP1A, ATP5G1</i>
miR-95-3p	0,1	Músculo	n.d.	Cáncer	n.d.
miR-191-3p	0,1	Ubicuo	n.d.	Cáncer, Alzheimer, infarto de miocardio	n.d.
miR-221-5p	0,1	Ubicuo	n.d.	Cáncer	n.d.
miR-500a-5p	0,06	Ubicuo	n.d.	n.d.	n.d.
miR-493-3p	0,05	Ubicuo	Biomarcador de placenta	n.d.	n.d.
miR-138-5p	0,05	Cerebro, médula espinal	Apoptosis, crecimiento neuronal	Cáncer	<i>CASP3, SIRT1</i>
miR-29a-5p	0,03	Músculo, tiroides	Proliferación, fibrosis	Cáncer, cardiomiopatía	<i>HDAC</i>
miR-182-5p	0,02	Ubicuo	n.d.	Cáncer, fallo cardíaco	n.d.

En negrita se resaltan los miRNAs que se encontraron desregulados en el modelo murino de AP
n.d. no hay datos

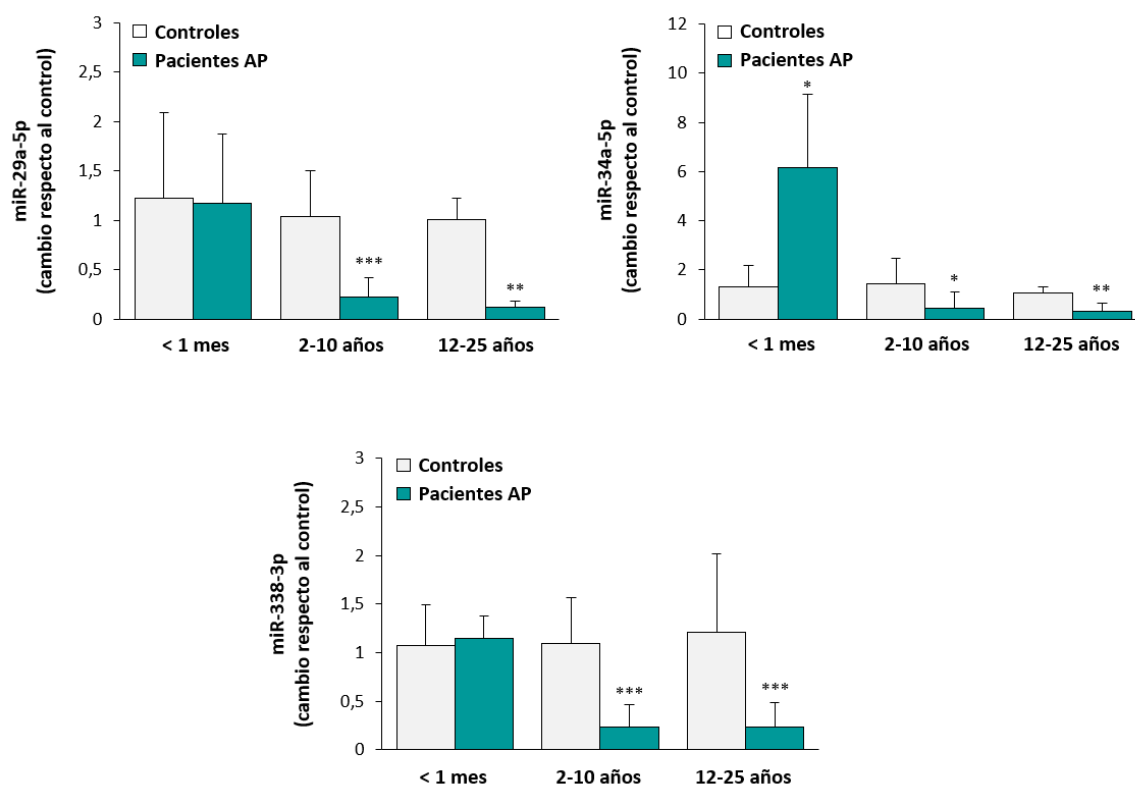


Figura 33. Análisis de miRNAs en el plasma de controles y pacientes con AP. Determinación de los niveles de miR-29a-5p, miR-34a-5p y miR-338-3p qRT-PCR en el plasma de individuos control y de pacientes neonatales (menores de un mes) (n = 8 por grupo), pacientes de entre dos y diez años en seguimiento (n = 12 por grupo) y pacientes de 12 a 25 años en seguimiento (n = 8 por grupo). La cantidad relativa de cada miRNA se calculó usando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ y los datos se normalizaron con miR-23a-3p. Cada histograma recoge la media y la desviación estándar de los datos. Análisis estadístico t de Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Asimismo, ya que una elevada proporción de los miRNAs alterados en el plasma de pacientes con AP menores de un año proceden de tejido cerebral (**Tabla 11**), se decidió analizar los niveles de miRNAs específicos de cerebro en el plasma de pacientes con AP de entre dos y diez años en seguimiento (n = 12 por grupo) y pacientes de 12 a 25 años en seguimiento (n = 8 por grupo). Para el estudio se escogieron los miRNAs miR-9-5p, miR-124-3p, miR-125b-5p, miR-128-3p, miR-132-3p, miR-138-5p y miR-146a-5p, previamente analizados en el cerebro del modelo murino de AP. De los siete miRNAs, solo miR-125b-5p, miR-128-3p, miR-132-3p y miR-146a-5p pudieron ser detectados en ambos grupos. Como puede observarse en la **figura 34**, se detectó una disminución significativa de los niveles de miR-146a-5p en los pacientes con AP de dos a diez años y de miR-125b-5p y miR-128-3p en el grupo de 12 a 25 años.

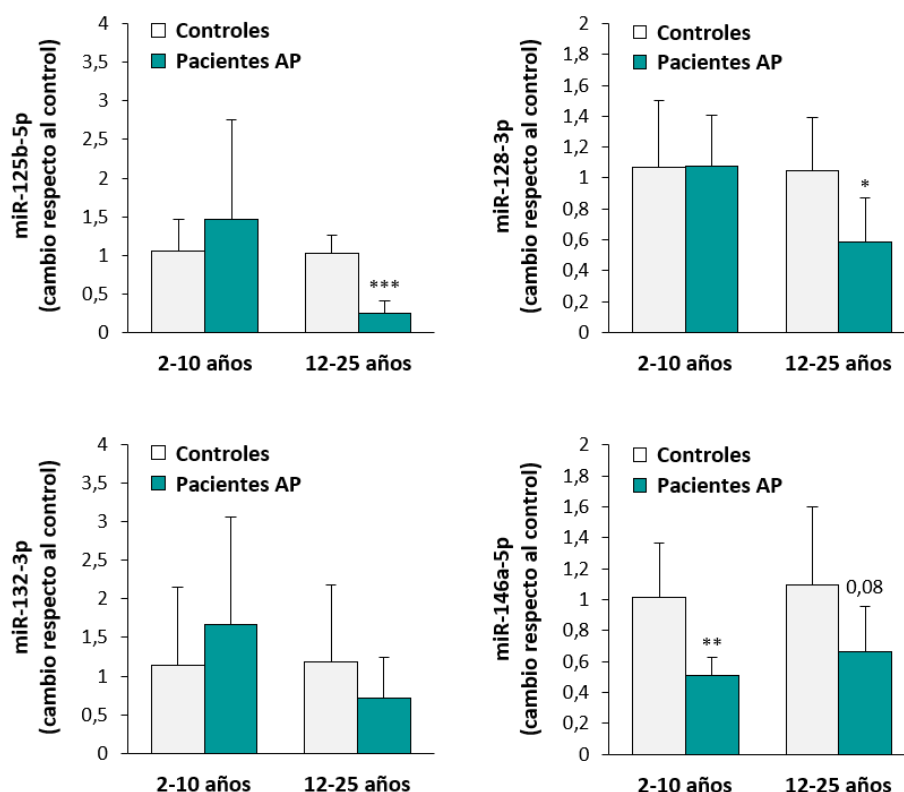


Figura 34. Análisis de miRNAs específicos de cerebro en el plasma de controles y pacientes con AP. Determinación de los niveles de miR-125b-5p, miR-128-3p, miR-132-3p y miR-146a-5p por qRT-PCR en el plasma de controles y pacientes de entre dos y diez años en seguimiento (n = 8 por grupo) y pacientes de 12 a 25 años en seguimiento (n = 8 por grupo). La cantidad relativa de cada miRNA se calculó usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y los datos se normalizaron con miR-23a-3p. Cada histograma recoge la media de los datos y la desviación estándar de los datos. Análisis estadístico t de Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Ya que los pacientes con AP parecen tener un perfil de miRNAs plasmático definido se decidió investigar la posibilidad de que éste pudiese ser diferente en pacientes con AMM aislada (MIM #251000), causada por mutaciones en el gen *MUT*, que codifica el enzima mitocondrial metilmalonil-CoA mutasa (MCM), o por defectos en *MMAB*, implicado en la síntesis de su cofactor adenosilcobalamina (Adocbl). Los pacientes con AP y con AMM aislada presentan cierta sintomatología común pero también desarrollan complicaciones características, como las cardiomiopatías y la enfermedad renal crónica, respectivamente (Baumgartner et al. 2014). Así, se analizaron los niveles de miR-29a-5p, miR-34a-5p y miR-338-3p por qPCR en muestras individuales de plasma procedentes de individuos control y pacientes con AMM (6 con defectos en *MUT* y 2 con defectos en *MMAB*) a diferentes edades: pacientes de entre dos y diez años en seguimiento (n = 3) y pacientes de 12 a 25 años en seguimiento (n = 5). Los niveles de los tres miRNAs se encontraron significativamente disminuidos en los pacientes con AMM de dos a diez años respecto de los controles de la misma edad (**Figura 35**). En el grupo de mayor edad solo se observó un descenso de miR-34a-5p, mientras que miR-29a-5p no fue detectado y miR-338-3p no varió significativamente.

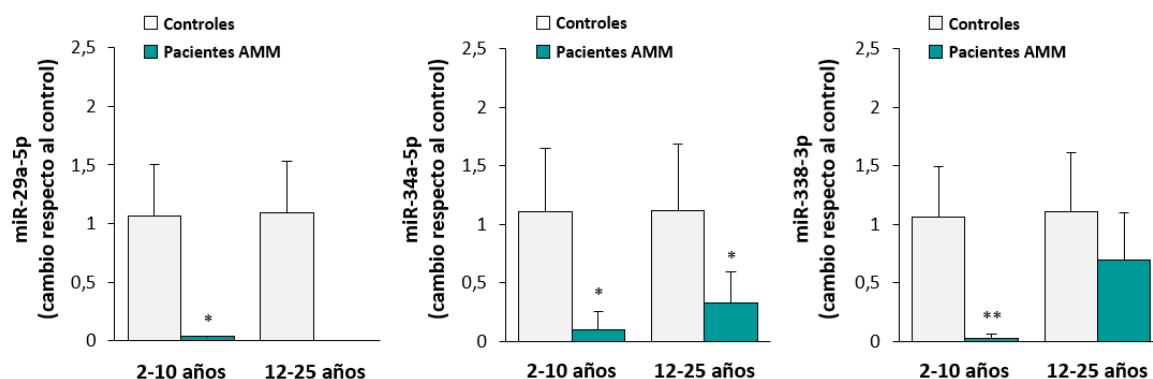
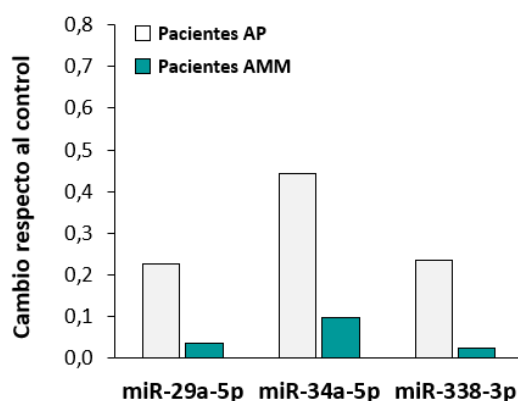


Figura 35. Análisis de miRNAs en el plasma de controles y pacientes con AMM. Determinación de los niveles de miR-29a-5p, miR-34a-5p y miR-338-3p qRT-PCR en el plasma de individuos control y de pacientes de entre dos y diez años en seguimiento (n = 3) y pacientes de 12 a 25 años en seguimiento (n = 5). La cantidad relativa de cada miRNA se calculó usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y los datos se normalizaron con miR-23a-3p. Cada histograma recoge la media y la desviación estándar de los datos. Análisis estadístico t de Student (*p<0,05; **p<0,01).

Además, se realizó una comparativa entre los perfiles de miRNAs plasmáticos de pacientes con AP y con AMM (Figura 36). Como puede observarse, los pacientes con AP de dos a diez años poseen mayores niveles de miR-29a-5p, miR-34a-5p y miR-338-3p respecto de los AMM con la misma edad (Figura 36A), mientras que en el grupo de 12 a 25 años no hay diferencias en miR-34a-5p y los pacientes AP poseerían mayores niveles de miR-29a-5p y menores de miR-338-3p respecto de los AMM (Figura 36B).

A) 2-10 años



B) 12-25 años

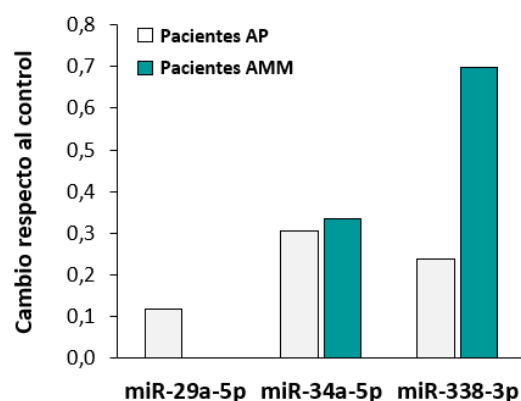


Figura 36. Perfiles de miR-29a-5p, miR-34a-5p y miR-338-3p en plasma de pacientes con AP y AMM. Comparativa entre los niveles plasmáticos de miR-29a-5p, miR-34a-5p y miR-338-3p entre pacientes con AP y con AMM de 2 a 10 años (panel A) y de 12 a 25 años (panel B).

DISCUSIÓN

1. Caracterización de nuevas variantes en *PCCA* y *PCCB* causantes de acidemia propiónica. Correlación genotipo-fenotipo 115
2. Papel de la disfunción mitocondrial y del estrés oxidativo en acidemia propiónica. ¿Nuevas dianas para el tratamiento de la enfermedad? 118
3. Identificación de miRNAs desregulados en acidemia propiónica: papel en la fisiopatología y potencial como nuevos biomarcadores 126

1. Caracterización de nuevas variantes en *PCCA* y *PCCB* causantes de acidemia propiónica. Correlación genotipo-fenotipo

Actualmente, la implementación de las técnicas de secuenciación masiva (NGS, *Next Generation Sequencing*) ha supuesto una revolución en el diagnóstico genético debido a que permite detectar múltiples variantes que subyacen el desarrollo de enfermedades humanas. Sin embargo, aunque la naturaleza de algunos cambios permite asignarlos un carácter patogénico, las variantes *missense* no suelen cumplir los criterios establecidos por el ACMG (*American College of Medical Genetics and Genomics*) para categorizarlas como benignas o patogénicas, por lo que son clasificadas como variantes de significado clínico incierto o VUS (*Variants of Uncertain Significance*). El número de cambios identificados en *PCCA* y *PCCB* causantes de AP ha crecido exponencialmente en los últimos tiempos. Hasta la fecha, más de 280 variantes han sido descritas en ambos genes, siendo las predominantes las mutaciones *missense*, seguidas de pequeñas deleciones e inserciones y de las mutaciones de *splicing*. En este trabajo se ha realizado una caracterización estructural y funcional de 22 variantes de significado clínico incierto identificadas en 23 pacientes con sospecha de AP, pudiéndose confirmar su efecto patogénico y, por tanto, que estos cambios son la causa de la deficiencia en PCC y del desarrollo de la enfermedad.

Como primera aproximación para determinar la potencial patogenicidad de las variantes se llevó a cabo un análisis *in silico* utilizando diferentes *softwares* bioinformáticos. Las 22 variantes, 21 cambios *missense* (11 en *PCCA* y 10 en *PCCB*) junto con una pequeña deleción en fase en *PCCB*, fueron predichas como patogénicas puesto que se localizan en residuos altamente conservados. Debe resaltarse que p.C712S en *PCCA* y p.G356R en *PCCB* fueron clasificadas como neutras por *Polyphen-2*, lo que pone de manifiesto la necesidad de utilizar diferentes programas para la predicción *in silico* de la patogenicidad de los cambios (Thusberg et al. 2011).

Aunque la realización de un análisis *in silico* puede constituir inicialmente una primera aproximación para determinar si un cambio genético puede ser patogénico o no, es necesaria la realización de estudios que confirmen experimentalmente que las variantes identificadas son la causa de la deficiencia. La validación del efecto patogénico de las variantes se llevó a cabo mediante la realización de un análisis estructural y un estudio funcional consistente en la medida de la actividad PCC y de los niveles de *PCCA* o *PCCB*, que reflejan la estabilidad de la proteína.

El mapeo de los diferentes cambios en el hetero-tetrámero $\alpha\beta\beta\alpha$ reveló que, de las variantes identificadas en *PCCA*, p.G175D y p.R399W distorsionarían el centro activo de la PCC al localizarse en el sitio de unión al ATP, lo que concuerda con que ambas carezcan de actividad. Estas afirmaciones coinciden con las reflejadas en otros estudios donde cambios *missense* cercanos al

centro activo resultan también en actividad PCC nula (Gallego-Villar et al. 2013). La mayor parte de las variantes a estudio, tanto en PCCA como en PCCB, desestabilizan la estructura de PCC por generación de impedimentos estéricos y por la pérdida y/o ganancia de interacciones con otros residuos. Generalmente, la desestabilización de la proteína va acompañada de su degradación y de una reducción de la actividad enzimática. Así, las variantes que reducen la estabilidad del holoenzima carecen o retienen niveles bajos tanto de proteína PCCA o PCCB como de actividad PCC. Otras variantes parecen no tener un efecto sustancial en la estructura del holoenzima, por lo que retienen proteína y actividad PCC como p.C712S en PCCA y p.G188A y p.H534R en PCCB. Resulta especialmente llamativo el 80% de actividad PCC detectado en el cambio p.G188A que, por tanto, podría ser clasificado como no patogénico. G188 es un residuo altamente conservado que se localiza en la interfase β - β . La flexibilidad de la cadena polipeptídica en esta región permitiría acomodar el cambio p.G188A, por lo que la variante retendría actividad tal y como se ha descrito para p.G188R (Gallego-Villar et al. 2013). En casos como este, los resultados del análisis funcional deben tomarse con cierta cautela puesto que el método seleccionado para analizar la actividad PCC está basado en un sistema de sobreexpresión de PCCA y PCCB que puede no reflejar fehacientemente las condiciones de las células *in vivo*. Además, hoy en día parece claro que variantes *missense* que no afectan los sitios canónicos de *splicing* pueden ser responsables de defectos en el procesamiento del mRNA (Nielsen et al. 2007; Olsen et al. 2014). La predicción *in silico* utilizando la herramienta *Human Splice Finder* (HSF) ha revelado que el cambio c.563G>C (p.G188A) inactiva un sitio potenciador del *splicing*, pudiendo impedirse así la unión del factor SRF1 y, por tanto, inducirse un procesamiento aberrante del mRNA. Al no disponer de muestra del paciente para la realización del perfil transcripcional, el análisis de c.563G>C mediante el sistema de minigenes permitiría determinar si la variante provoca en realidad un defecto en el *splicing*. En cuanto a p.Q58P, el cambio parece no desestabilizar la estructura del holoenzima, sin embargo, carece de actividad a pesar de poseer un 80% de proteína PCCB. Al igual que p.Q58P, otros cambios identificados en PCCB cercanos al extremo amino terminal retienen proteína pero presentan actividad PCC nula (Perez-Cerda et al. 2003).

Como se ha mencionado, las variantes que desestabilizan la estructura del complejo son más susceptibles de ser degradadas. La degradación de proteínas que portan cambios *missense* puede estar promovida por defectos en el plegamiento o en el ensamblaje del complejo enzimático. Por ejemplo, el cambio p.R512H (PCCB) descrito en este estudio parece afectar a un residuo esencial para la formación del homodímero β - β , lo que podría explicar la ausencia de proteína y de actividad. De hecho, la variante p.R512C es incapaz de establecer dicha interacción (Muro et al. 2000). El análisis del crecimiento de fibroblastos de pacientes en condiciones permisivas de plegamiento

(28°C) ha evidenciado la existencia de un defecto de plegamiento en algunas de las variantes incluidas en el estudio. Fibroblastos de pacientes portadores en heterocigosis de los cambios p.R230C (PCCA), p.C712S (PCCA) y p.H250Y (PCCB) carecen de actividad PCC respecto de fibroblastos control, sin embargo, tanto los niveles de proteína como la actividad pueden ser recuperados ligeramente tras su crecimiento a 28°C. Las chaperonas farmacológicas se han constituido como una estrategia terapéutica viable para un amplio número de enfermedades causadas por defectos en el plegamiento (Gamez et al. 2018). El uso de estas pequeñas moléculas que facilitan el plegamiento de las proteínas podría ser útil para la recuperación de la actividad PCC en pacientes portadores de dichos cambios.

La determinación de la severidad de las mutaciones junto con el análisis de los datos clínicos disponibles permite establecer la correlación entre el genotipo y el fenotipo de los pacientes, fundamental para predecir el pronóstico de la enfermedad. La relación genotipo-fenotipo es especialmente clara en pacientes homocigotos. La mayor parte de los pacientes deficientes en PCCA presentan la forma neonatal de la enfermedad y portan en homocigosis variantes que carecen de actividad PCC (**Tabla 10 y 11**), como ya ha sido señalado en otros estudios (Clavero et al. 2002). De la misma manera, cambios que retienen actividad PCC, como p.G188A en el paciente 16, se corresponden con la forma tardía de la AP. Esta variante mimetiza los resultados obtenidos con p.N536D, que retiene un 80% de actividad y está presente en pacientes con un fenotipo moderado/suave (Perez-Cerda et al. 2003).

El establecimiento de la correlación genotipo-fenotipo es más inconsistente en pacientes heterocigotos debido a la complejidad de establecer el grado de contribución de cada alelo a la deficiencia. En este trabajo se han podido establecer algunas relaciones: pacientes con una variante *missense* sin actividad junto con una mutación de actividad nula presentan la forma neonatal de la AP (**Tabla 10 y 11**), mientras que la retención de actividad PCC por parte de una de las variantes se puede asociar a la presentación tardía de la enfermedad. Por ejemplo, el cambio p.R230C se ha identificado en un paciente (P6) que, aunque porta en el otro alelo PCCA una mutación nula (Desviat et al. 2009), debutó de manera tardía. De la misma manera, el cambio p.E168del carece de actividad pero se encuentra presente en heterocigosis en un paciente (P15) junto con una variante *missense* cuya actividad, analizada en un sistema de expresión procariota, corresponde a un 78% (Desviat et al. 2004), lo que justificaría la presentación tardía de la enfermedad. En el caso del paciente 18, la variante p.R272W retiene cierta actividad y la presente en el otro alelo PCCB es un cambio *missense* asociado a un fenotipo moderado (Perez et al. 2003), por lo que ambos podrían contribuir a la presentación tardía de la enfermedad. El establecimiento de estas observaciones no es arbitrario ya que otros estudios han apuntado que pacientes con un fenotipo moderado de AP son portadores

de mutaciones *missense* que retienen niveles bajos-intermedios de actividad PCC (Clavero et al. 2002; Perez-Cerda et al. 2003). El caso opuesto lo hemos encontrado en el paciente 23 que presenta la forma neonatal de la AP a pesar de portar la variante p.H534R que retiene actividad. En este punto debemos considerar la posibilidad de que el cambio sea en realidad una variante de *splicing*. El análisis de c.1601A>G (p.H534R) utilizando la herramienta HSF reveló la potencial alteración de un sitio potenciador del *splicing* que impediría la unión del factor Tra2- β y, por tanto, el correcto procesamiento del mRNA. Por otra parte, debe tenerse también en cuenta que las mutaciones *missense* poseen un amplio espectro de manifestaciones clínicas debido a que la maquinaria celular de plegamiento y degradación de proteínas (*protein quality control*) puede variar de unos individuos a otros. Así, una misma variante puede presentarse clínicamente de maneras diferentes: p.V205D (PCCB) con un 28% de actividad ha sido identificada en homocigosis en pacientes con una presentación tardía y neonatal (Perez-Cerda et al. 2003). El contexto celular, por tanto, podría explicar también el fenotipo severo del paciente 23, así como otros factores genéticos y ambientales (alimentación, presencia o no de episodios febriles, etc.).

En resumen, este trabajo ha supuesto la caracterización de 22 nuevos cambios causantes de AP, siendo la mayor parte de ellos variantes que desestabilizan el holoenzima. Así, el tratamiento con chaperonas farmacológicas podría constituirse como una estrategia terapéutica viable para la AP.

2. Papel de la disfunción mitocondrial y del estrés oxidativo en acidemia propiónica. ¿Nuevas dianas para el tratamiento de la enfermedad?

Actualmente, los tratamientos disponibles para la AP no previenen ni revierten eficazmente la patología multiorgánica asociada a la enfermedad. Por ello, es de vital importancia identificar vías alteradas y definir nuevas dianas para el desarrollo de estrategias terapéuticas alternativas. En este punto los modelos murinos de enfermedades se han constituido como instrumentos esenciales en la investigación biomédica. La generación del modelo murino de AP (Guenzel et al. 2013) ha permitido establecer un modelo útil para estudiar los mecanismos fisiopatológicos que subyacen el desarrollo de la sintomatología de la enfermedad. Así, en este trabajo hemos utilizado este modelo para evaluar la función mitocondrial y la homeostasis redox con el fin de determinar su contribución a la patología y encontrar nuevos tratamientos modificadores del curso de esta grave enfermedad neurometabólica que permita mejorar el manejo clínico de los pacientes.

Como una primera tentativa para valorar ambos procesos decidimos aplicar la técnica RPPma, basada en la cuantificación de proteínas del metabolismo energético, que ha permitido establecer la firma bioenergética en cáncer (Aldea et al. 2011) y en diferentes enfermedades neuromusculares

(Santacatterina et al. 2015). El uso de esta aproximación experimental no solo es relevante a la hora de entender la patología, sino también para identificar marcadores de diagnóstico y seguimiento e, incluso, para discriminar enfermedades relacionadas (Santacatterina et al. 2015; Santacatterina et al. 2018). Los resultados del RPPma en el modelo murino de AP mostraron cambios en los niveles de proteínas implicadas en la glicolisis, la fosforilación oxidativa y la defensa antioxidante, entre otros, reflejando que tanto la función mitocondrial como la homeostasis redox estaban potencialmente alterados en todos los tejidos analizados. Tomando estos resultados como base y junto con los obtenidos del análisis de otros parámetros para evaluar ambos procesos, hemos conseguido establecer la firma bioenergética del cerebro, el corazón, el hígado y el músculo del modelo murino de AP (**Figura 37**).

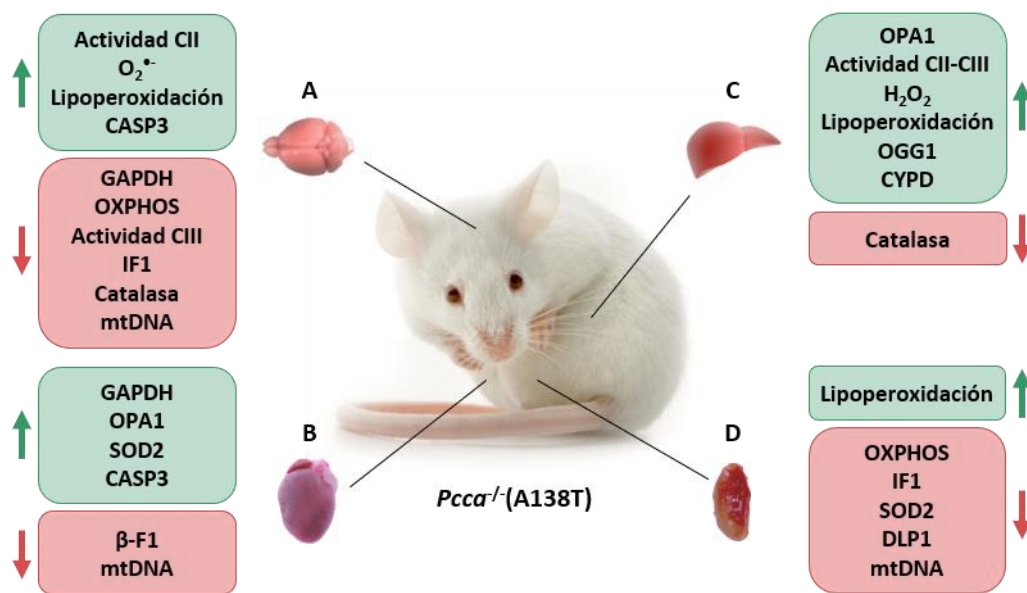


Figura 37. Esquema de las alteraciones encontradas en los distintos órganos del modelo murino de AP. A) Cerebro; B) Corazón; C) Hígado; D) Músculo. β -F1: *ATP synthase beta-subunit*; CASP3: caspasa-3; CYPD: ciclofilina D; DLP1: *Dynamin-1-like protein*; GAPDH: gliceraldehído-3P-deshidrogenasa; IF1: *ATPase inhibitor*; OGG1: 8-oxo-guanina DNA glicosilasa 1; OPA1: *Dynamin-like 120 kDa protein*; SOD: superóxido dismutasa.

El **cerebro** es un órgano altamente dependiente de la mitocondria debido a sus elevados requerimientos energéticos (Benard et al. 2006; Fernandez-Vizarra et al. 2011). No es sorprendente, por tanto, que la disfunción mitocondrial se haya constituido como uno de los mecanismos que subyacen al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Cabezas-Opazo et al. 2015; Exner et al. 2012) y de diferentes EMH que cursan con sintomatología neurológica (Brasil et al. 2015; Fourcade et al. 2014; Wos et al. 2016). Nuestros estudios en el cerebro del modelo murino de AP han mostrado un descenso de los niveles de diferentes subunidades de los complejos de la CTE, una reducción de la actividad del complejo CIII y depleción de mtDNA (**Figura 37A**), lo que sugeriría una perturbación de la fosforilación oxidativa. Ante este posible déficit energético, el

incremento de la actividad del complejo CII y la disminución de IF1 podrían entenderse como mecanismos adaptativos puestos en marcha por las neuronas para hacer frente a la reducción del metabolismo mitocondrial. El aumento de la actividad de CII ha sido descrito como un mecanismo compensatorio ante defectos en OXPHOS en un modelo de Parkinson (Stauch et al. 2016). Por otro lado, la inhibición de IF1, el inhibidor de la H^+ -ATP sintasa, parece ser una estrategia celular contra las perturbaciones de la CTE (Chen et al. 2014). Asimismo, IF1 es el responsable de la reprogramación metabólica que sufren no solo las células cancerosas (Formentini et al. 2012) sino también las neuronas (Formentini et al. 2014). En éstas, la sobreexpresión de IF1 reduce la fosforilación oxidativa y estimula la glicolisis a través del aumento de los niveles de GAPDH. Ya que el silenciamiento de IF1 posee el efecto contrario en diferentes tipos celulares (Formentini et al. 2012; Sanchez-Arago et al. 2013), la reducción de IF1 observada en el cerebro del modelo murino de AP podría ser la responsable del descenso de los niveles de GAPDH (**Figura 37A**). Estos resultados apuntan a una potencial alteración de la glicolisis y de la fosforilación oxidativa que se traduciría en un déficit energético global.

Una de las consecuencias de la disfunción mitocondrial es la producción exacerbada de ROS debida a la ineficiente transferencia de electrones a la molécula de oxígeno. La tinción con DHE ha revelado un incremento de los niveles de radical superóxido en el cerebro del modelo murino de AP (**Figura 37A**) y, aunque no se han podido analizar los niveles de peróxido de hidrógeno con la sonda MitoB debido a su acumulación preferente en otros tejidos (Logan et al. 2014), podría deducirse la existencia de un exceso de esta ROS como consecuencia del descenso de catalasa. El cerebro es particularmente sensible al estrés oxidativo debido a que las membranas neuronales son ricas en ácidos grasos poliinsaturados. En este sentido, se ha detectado un aumento de lípidos peroxidados que, a su vez, propagan un círculo vicioso de daño oxidativo que puede comprometer la viabilidad celular. Aunque no ha podido detectarse la forma activa, el aumento de los niveles de caspasa-3 total supondría una mayor susceptibilidad de las neuronas a la muerte celular por apoptosis (Kerr et al. 2004). Por todo ello, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo podrían ser responsables de la sintomatología neurológica característica de la AP (Nizon et al. 2013; Pena et al. 2012a; Pena et al. 2012b; Schreiber et al. 2012). Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que el estriado, región afectada en pacientes con la enfermedad (Johnson et al. 2009; Perez-Cerda et al. 1998), es altamente vulnerable al déficit energético (Nishino et al. 2000). De hecho, ya que el estriado está constituido fundamentalmente por neuronas GABAérgicas, la inhibición de la GABA transaminasa por el propionato y, por tanto, de la actividad del TCA permitiría también explicar por qué esta región degenera de manera frecuente en pacientes con AP (Morland et al. 2018).

El **corazón** requiere de la producción de elevadas cantidades de ATP para poder sostener su actividad contráctil. Para satisfacer estos requerimientos energéticos los cardiomiocitos obtienen la energía a través de la β -oxidación y la subsecuente fosforilación oxidativa por lo que, al igual que el cerebro, es un órgano altamente dependiente del correcto funcionamiento de la mitocondria. Así, resulta especialmente relevante haber detectado en el corazón del modelo murino de AP un descenso de los niveles de β -F1 y un incremento de GAPDH (**Figura 37B**), además de la reducción significativa de las razones β -F1/HSP60, β -F1/GAPDH y β -F1/LDHA. Los resultados reflejan, por un lado, la existencia de un menor contenido mitocondrial (β -F1/HSP60) y celular (β -F1/GAPDH) de β -F1 y, por otro lado, la prevalencia de la glicolisis frente a la fosforilación oxidativa. Apoyando esta afirmación, estudios previos del laboratorio han mostrado una disminución de la actividad de complejos de la CTE en el corazón de estos ratones (Gallego-Villar 2015). En línea con nuestras observaciones, muestras cardíacas procedentes de pacientes con AP presentan una deficiencia en la actividad y niveles de proteína de diferentes complejos (de Keyzer et al. 2009; Fragaki et al. 2011; Mardach et al. 2005). El cambio metabólico hacia la glicolisis como método para la obtención de energía en el corazón es uno de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de alteraciones cardíacas (Tham et al. 2015). Ya que están presentes en el modelo murino (Guenzel et al. 2013) y han sido descritas en pacientes con AP (Bhan et al. 2001; Laemmle et al. 2014; Lee et al. 2009; Mardach et al. 2005), dicho cambio metabólico podría reflejar la aparición de la disfunción cardíaca en AP. De la misma manera que sucede en el cerebro, los cardiomiocitos ponen en marcha una serie de mecanismos para compensar el potencial déficit energético y combatir la depleción de mtDNA (**Figura 37B**). En este caso, el aumento de los niveles de la proteína OPA1 podría asociarse a un aumento de la fusión mitocondrial. Ante el incremento de los niveles de caspasa-3 total, la inducción de la fusión mitocondrial podría también proteger a los cardiomiocitos frente a la muerte celular, tal y como se ha descrito (Nunnari et al. 2012). Cabe destacar que la apoptosis es otro de los mecanismos que subyace a la remodelación cardíaca en diferentes cardiomiopatías (Tham et al. 2015). A pesar de que los resultados indican la existencia de una disfunción mitocondrial en el corazón, no se han detectado con las técnicas empleadas variaciones en los niveles de radical superóxido o de peróxido de hidrógeno ni en los marcadores de daño oxidativo a proteínas, lípidos o DNA, lo cual podría explicarse por el incremento de defensas antioxidantes como SOD2 (**Figura 37B**). Por otro lado, el déficit energético puede alterar la función de canales iónicos esenciales para la actividad eléctrica de los cardiomiocitos y, por tanto, perturbar el ritmo cardíaco (Yang et al. 2014), dando lugar a las arritmias que son frecuentes en AP (Pena et al. 2012a; Pena et al. 2012b).

El **hígado** es un órgano clave en la fisiología del organismo debido a su estricta regulación del metabolismo. Entre sus múltiples funciones se encuentra la oxidación de aminoácidos, por lo que

el hígado se ha constituido como la principal fuente de generación de propionil-CoA en AP y ha adquirido gran relevancia en la sintomatología de la enfermedad. De hecho, el trasplante hepático se ha establecido como una estrategia terapéutica que permite mejorar la calidad de vida de los pacientes (Arrizza et al. 2015; Nagao et al. 2013; Romano et al. 2010). Nuestros estudios en el hígado del modelo murino de AP han revelado diferentes alteraciones asociadas a la función mitocondrial y la homeostasis redox. Fundamentalmente, hemos encontrado un incremento de la actividad de los complejos de la CTE que podría estar asociado a una mayor fusión mitocondrial inducida por los elevados niveles de OPA1 (**Figura 37C**). Aunque en el hígado de pacientes con AP no hay evidencias de la presencia de megamitocondrias, éstas si han sido detectadas tanto en hepatocitos de un modelo murino (Chandler et al. 2009) como de pacientes con AMM (Chandler et al. 2009; Wilnai et al. 2014), acidemia orgánica relacionada con la AP. La mayor actividad de los complejos de la CTE podría asociarse a una producción exacerbada de anión superóxido que la catalasa, al exhibir niveles reducidos (**Figura 37C**), no podría contrarrestar. El incremento de ROS induce daño oxidativo a lípidos y DNA, tal y como se deduce del aumento de los niveles de MDA y de OGG1, respectivamente. Además, el estrés oxidativo hepático podría ser el responsable del incremento de CYPD, componente del poro de transición mitocondrial, y potencialmente inducir la muerte celular por necrosis. De hecho, se ha propuesto en un modelo de adrenoleucodistrofia que el incremento de la muerte celular estaría mediado por CYPD en respuesta a estrés oxidativo (Lopez-Erauskin et al. 2012).

Al igual que el corazón, el **músculo esquelético** es altamente dependiente de la fosforilación oxidativa y, por tanto, de la mitocondria para la obtención de grandes cantidades de ATP necesarias para su actividad contráctil. Nuestros estudios parecen indicar que este proceso podría estar potencialmente alterado en el músculo del modelo murino de AP. Por un lado, todas las subunidades de los diferentes complejos de la CTE analizadas están significativamente disminuidas (**Figura 37D**), a lo que hay que añadir la reducción de la actividad del complejo CIII detectada en estudios previos del laboratorio (Gallego-Villar 2015). Alteraciones similares se han encontrado en biopsias de músculo esquelético procedentes de pacientes con AP (de Keyzer et al. 2009). La posible perturbación de la fosforilación oxidativa se ve reforzada por el descenso de la razón β -F1/LDHA, al igual que sucede en diferentes enfermedades neuromusculares (Santacatterina et al. 2015). Como se ha mencionado anteriormente, la inhibición de IF1 estimula la fosforilación oxidativa (Formentini et al. 2012; Sanchez-Arago et al. 2013) y puede atenuar las perturbaciones de la CTE (Chen et al. 2014). Por ello, la reducción de IF1 puede constituirse como un mecanismo de respuesta para aumentar la actividad de la H⁺-ATP sintasa y contrarrestar así el posible déficit energético. Además, la función mitocondrial es altamente dependiente de la integridad de la red de este orgánulo, para

lo que debe existir un correcto balance entre los procesos de fusión y fisión. DLP1 (*Dynamin-1-like protein*), también conocida como DRP1, media la fisión mitocondrial y, por tanto, la eliminación de mitocondrias disfuncionales en un proceso conocido como mitofagia. La pérdida de DLP1 provoca la inhibición de la fisión mitocondrial y, como consecuencia, el mantenimiento de mitocondrias dañadas (Twig et al. 2008). Además, su reducción se ha asociado a la aparición de mitocondrias alargadas que poseen un menor contenido de mtDNA (Parone et al. 2008). De este modo, la inhibición de la fisión mediada por el descenso de DLP1 podría también contribuir a la disfunción mitocondrial en el músculo del modelo murino de AP (**Figura 37D**). Biopsias de músculo esquelético procedentes de pacientes con la enfermedad han mostrado la presencia de megamitocondrias (Schwab et al. 2006), por lo que el análisis de la morfología mitocondrial en el modelo murino permitiría corroborar el desbalance entre fusión y fisión mitocondrial como la causa de la aparición de estos orgánulos. En línea con esta hipótesis, la depleción de mtDNA y el daño oxidativo a lípidos detectados no solo podrían explicarse por el acúmulo de ROS ante la pérdida de capacidad antioxidante (descenso de SOD2), sino también por el mantenimiento de mitocondrias dañadas debido al descenso de la mitofagia mediada por la reducción de DLP1.

En definitiva, el conjunto de estudios realizados en el modelo murino de AP ha revelado que la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo desempeñan un papel importante en la fisiopatología de la enfermedad, de acuerdo con las observaciones en muestras procedentes de pacientes con AP (de Keyser et al. 2009; Fragaki et al. 2011; Gallego-Villar et al. 2013; Mardach et al. 2005; Mc Guire et al. 2009; Schwab et al. 2006; Yano et al. 2003). Estos resultados sugieren que el uso de compuestos moduladores de la función mitocondrial y antioxidantes podrían servir como terapia adyuvante que permita aliviar la sintomatología de la enfermedad.

El empleo de compuestos antioxidantes ha proporcionado efectos terapéuticos positivos en diferentes patologías (Poprac et al. 2017; Rajendran et al. 2014). De este modo, en este trabajo hemos evaluado el efecto de los antioxidantes MitoQ y resveratrol en el modelo murino de AP. Estudios *in vitro* habían demostrado que el tratamiento con distintos antioxidantes podía reducir los niveles de ROS en fibroblastos procedentes de pacientes (Gallego-Villar et al. 2014).

El resveratrol es un antioxidante que se encuentra de forma natural en diferentes alimentos y que ha sido extensivamente estudiado en el ámbito de la investigación terapéutica. A pesar de su baja biodisponibilidad (Smoliga et al. 2014), los efectos beneficiosos del resveratrol han sido ampliamente recogidos en múltiples estudios en modelos de enfermedades humanas en las que la disfunción mitocondrial contribuye al desarrollo de la fisiopatología (Chan et al. 2008; Kim et al. 2007; Morato et al. 2015; Mudo et al. 2012; Sung et al. 2015). Contrariamente a los buenos

resultados obtenidos *in vivo*, existe una gran controversia acerca de la eficacia del resveratrol en humanos debido a las grandes discrepancias entre ensayos clínicos (Berman et al. 2017). Varios estudios han mostrado que el resveratrol es capaz de reducir los niveles de diferentes marcadores asociados a Alzheimer y que en enfermedades cardiovasculares puede mejorar la función sistólica y diastólica. Sin embargo, otros estudios han apuntado que la administración de resveratrol puede no tener ningún efecto beneficioso para los pacientes.

Una de las limitaciones de los antioxidantes en el tratamiento de este tipo de enfermedades es su reducida localización en la mitocondria. Para solventar esta problemática se han desarrollado compuestos sintéticos que mejoran el rendimiento de los antioxidantes naturales en cuanto a su distribución. Uno de estos compuestos es el MitoQ, un catión lipofílico de trifenilfosfonio conjugado a una ubiquinona que se acumula preferentemente en la mitocondria donde alcanza concentraciones que poseen relevancia terapéutica (Smith et al. 2003). Varios estudios pre-clínicos han mostrado los efectos protectores que MitoQ posee en diferentes modelos de enfermedad (Miquel et al. 2014; Ribeiro Junior et al. 2018; Yin et al. 2016). Gracias a que la administración a largo plazo carece de efectos adversos (Rodriguez-Cuenca et al. 2010), MitoQ ha alcanzado la primera y segunda fase de dos ensayos clínicos. En un estudio realizado en pacientes con Parkinson no se observaron diferencias en la progresión de la enfermedad entre aquellos individuos tratados con un placebo o con distintas dosis de MitoQ (Snow et al. 2010). La baja distribución del compuesto en el cerebro junto con el tardío diagnóstico de la enfermedad pueden ser factores que imposibiliten que MitoQ posea efectos positivos en este tipo de pacientes. Por el contrario, la administración de MitoQ en pacientes con hepatitis C parece poder revertir el daño hepático causado por la infección del virus (Gane et al. 2010).

En este trabajo hemos mostrado que la administración oral de MitoQ y resveratrol revierte el daño oxidativo que contribuye a la fisiopatología del modelo murino de AP. Hoy en día parece bastante claro que *in vivo* este tipo de compuestos actúan de manera indirecta sobre las ROS a través de la activación de vías que promueven la respuesta antioxidante (Forman et al. 2014; Schmidt et al. 2015). MitoQ y resveratrol inhiben KEAP1 y activan la vía PI3K/AKT para aumentar la vida media de NRF2, factor de transcripción responsable de promover la expresión de genes implicados en la respuesta antioxidante (Hayes et al. 2014). Además de su efecto sobre NRF2, resveratrol contribuye a la defensa antioxidante y estimula la biogénesis mitocondrial a través la activación transcripcional de PGC1 α y FOXO3 mediada por su acción directa sobre SIRT1. Así, el tratamiento con MitoQ y resveratrol ha promovido un incremento de los niveles de enzimas antioxidantes en el modelo murino de AP, fundamentalmente en el corazón y el hígado. Además, y de acuerdo con una posible disminución de ROS, se ha detectado una reducción significativa de los

niveles de marcadores daño oxidativo a lípidos y DNA en dichos órganos tras el tratamiento con el correspondiente antioxidante. El efecto diferencial de este tipo de compuestos en distintos tejidos se debe fundamentalmente a su biodistribución en el organismo. MitoQ se acumula preferentemente en el hígado, el corazón y el riñón y minoritariamente en el cerebro tras su administración oral (Rodríguez-Cuenca et al. 2010; Smith et al. 2003), mientras que el resveratrol presenta una baja biodisponibilidad pero parece alcanzar diferentes tejidos humanos (Smoliga et al. 2014). Estudios futuros para la detección de anión superóxido y peróxido de hidrógeno, así como la evaluación en profundidad de la función mitocondrial permitirán obtener una visión global de aquellos procesos sobre los que actúan estos compuestos.

El tratamiento con compuestos antioxidantes no solo proporciona protección frente al daño oxidativo sino también frente a la muerte celular por necrosis. En un modelo murino de adrenoleucodistrofia en el que la acumulación de estrés oxidativo provoca un incremento de los niveles de CYPD y, por tanto, la apertura del mPTP, el tratamiento con los antioxidantes N-acetilcisteína y ácido lipoico contrarresta este efecto mediado por las ROS (Lopez-Erauskin et al. 2012). El descenso de los niveles de CYPD en el hígado de los ratones AP tras la administración oral de resveratrol corrobora el mecanismo de acción de este compuesto antioxidante sobre la regulación del mPTP y su uso para mitigar la muerte celular por necrosis.

Uno de los aspectos más relevantes del trabajo es que el tratamiento tanto con MitoQ como con resveratrol normaliza los niveles de BNP en el corazón del modelo murino de AP, indicando que ambos compuestos podrían retrasar el desarrollo de la disfunción cardiaca. Actualmente, se desconoce el mecanismo a través del cual MitoQ reduce la expresión de BNP, sin embargo, se ha determinado que el resveratrol es capaz de activar AMPK y modular la vía de NFAT. NFAT es un factor de transcripción cuya actividad es dependiente de su estado de fosforilación. NFAT defosforilado se localiza en el núcleo donde dirige la expresión, entre otros, de ANP (*Nppa*, *Natriuretic peptide A*) y BNP. Su fosforilación promueve su translocación al citoplasma celular y, por tanto, su inactivación. La activación de AMPK por resveratrol induce la fosforilación de NFAT y la inhibición de la transcripción mediada por éste (Chan et al. 2008).

En conclusión, nuestro trabajo ha mostrado el potencial efecto beneficioso que el tratamiento con MitoQ y resveratrol podría tener en AP. Futuros estudios para caracterizar la función cardiaca y neurológica en el modelo murino de la enfermedad permitirán determinar si el tratamiento con este tipo de compuestos puede suponer una mejora de la sintomatología y, por tanto, poseer un beneficio clínico real. Estos análisis son, por tanto, necesarios para que MitoQ y resveratrol puedan alcanzar los ensayos clínicos en pacientes con AP.

3. Identificación de miRNAs desregulados en acidemia propiónica: papel en la fisiopatología y potencial como nuevos biomarcadores

Desde su descubrimiento hasta la actualidad el estudio de los miRNAs ha ido cobrando mayor relevancia en el ámbito de la investigación biomédica debido a que se han descrito miRNAs desregulados en numerosas patologías humanas, como cardíacas (Wang et al. 2016b), neurodegenerativas (Cao et al. 2016) y metabólicas (Rottiers et al. 2012), entre otras. La identificación de miRNAs alterados en el contexto patológico posee gran significado biológico puesto que no solo permite clarificar los mecanismos moleculares que contribuyen al desarrollo de la enfermedad, sino también identificar nuevas dianas terapéuticas. Además, dada su presencia en diferentes fluidos corporales, los miRNAs están siendo utilizados actualmente como marcadores mínimamente invasivos de enfermedad (Nagaraj et al. 2017; Perfetti et al. 2017; Toro et al. 2018; Vallelunga et al. 2014). Este trabajo constituye la primera evidencia de la implicación de los miRNAs en la fisiopatología de la AP. Para ello, hemos analizado el perfil de miRNAs en el modelo murino de AP y en muestras plasmáticas de pacientes con el fin de investigar su potencial como nuevos biomarcadores.

El análisis del miRnoma hepático en el modelo murino de AP reveló la presencia de 14 miRNAs desregulados, de los que miR-34a-5p, miR-338-3p y miR-350 se encontraron también significativamente aumentados en el cerebro y el corazón a diferentes edades. Dado el control que estos miRNAs ejercen sobre la expresión de dianas implicadas en la función mitocondrial, la respuesta a estrés oxidativo y la muerte celular, estos resultados no solo refuerzan las conclusiones argumentadas anteriormente que apuntan a una disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y apoptosis como factores que contribuyen a la sintomatología de la AP, sino que también evidencian la posible implicación de dichos miRNAs en la fisiopatología de la enfermedad.

Hasta la fecha, pocos estudios han recogido las posibles funciones de miR-338 y miR-350 en el organismo. miR-338 es un miRNA enriquecido en el cerebro que regula la actividad axonal a través del control de proteínas del metabolismo energético mitocondrial (Aschrafi et al. 2008; Aschrafi et al. 2012), mientras que miR-350 es un miRNA murino que se expresa mayoritariamente en el corazón donde es capaz de estimular el desarrollo de hipertrofia cardíaca mediante la activación de NFAT debido al control que ejerce sobre p38 y JNK (Ge et al. 2013). Claramente, el papel de miR-34a en enfermedad es el que más ampliamente ha sido investigado, especialmente en el ámbito del cáncer (Rokavec et al. 2014). De hecho, miR-34a ha sido el primer miRNA en alcanzar los ensayos clínicos en un estudio que ha reflejado la posibilidad de utilizar la modulación de miRNAs como una estrategia terapéutica segura y eficaz para el tratamiento de tumores sólidos (Beg et al. 2017).

miR-34a es uno de los miembros de la familia miR-34 que incluye también a sus homólogos miR-34b y miR-34c. El gen que codifica miR-34a está localizado en el cromosoma 1 en humanos y en el 4 en ratones y, a pesar de expresarse de manera ubicua (*Human miRNA Tissue Atlas*), es particularmente abundante en el cerebro (Kasai et al. 2016) y el corazón (Boon et al. 2013), por lo que se ha visto implicado en la regulación de las funciones neurológica y cardíaca. miR-34a se ha encontrado aumentado en el cerebro de pacientes con Alzheimer (Sarkar et al. 2016) y en modelos murinos de la enfermedad (Sarkar et al. 2016; Wang et al. 2009). Asimismo, diferentes estados patológicos cardíacos como el deterioro prematuro, el infarto de miocardio y la hipertrofia cardíaca inducida vía constricción aórtica transversal inducen la expresión de miR-34a en el corazón (Boon et al. 2013; Bernardo et al. 2012). De este modo, decidimos centrarnos en miR-34a-5p con el fin de esclarecer su papel en las diferentes complicaciones observadas en pacientes con AP.

El análisis de las dianas de miRNAs permite determinar las vías de señalización moduladas por éstos y, por tanto, caracterizar los procesos alterados que pueden contribuir al desarrollo de una patología. De las dianas validadas experimentalmente para miR-34a-5p seleccionamos inicialmente BCL2, MEK1 y SIRT1 debido a su implicación en procesos relevantes para la fisiopatología de la AP. El estudio de estas dianas en el modelo murino ha revelado que el incremento de miR-34a-5p está asociado a la represión de BCL2 en el cerebro y el corazón tanto a 8 como a 20 semanas, así como a un descenso de MEK1 en todos los tejidos analizados a las 8 semanas. Aunque BCL2 y MEK1 son dianas que han sido validadas experimentalmente en varios sistemas, nuestros estudios funcionales utilizando diferentes líneas celulares han permitido corroborar estas observaciones. En contraposición, se ha encontrado un incremento de MEK1 en el corazón y en el hígado y de SIRT1 en el hígado de los ratones AP de 20 semanas de edad. Esta variabilidad podría ser consecuencia de una regulación tejido-específica, así como de los niveles del mRNA diana y de la presencia de reguladores de la actividad de los miRNAs como circRNAs y lncRNAs (Thomson et al. 2016).

En general, si parece clara la regulación que miR-34a-5p ejerce sobre BCL2 en el modelo de AP. BCL2 es una proteína que, a través del control de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, suprime la apoptosis. Así, el descenso de BCL2 tanto en el cerebro como en el corazón del modelo murino de AP podría estar asociado a una mayor vulnerabilidad de las neuronas y los cardiomiocitos a la muerte celular. Estos resultados concuerdan con el incremento de caspasa-3 detectado en ambos tejidos. Por ello, miR-34a-5p podría contribuir a la sintomatología de la AP a través de la modulación de la apoptosis, mecanismo que está implicado en otros procesos patológicos como la neurodegeneración y el daño cardíaco.

El análisis de nuevas dianas y de las vías en las que participan no solo es importante para profundizar en el papel de miR-34a-5p en AP, sino también para poder establecer la modulación de este miRNA como una posible estrategia terapéutica. Varios estudios han apuntado el efecto beneficioso que la inhibición de miR-34a posee en un modelo de Alzheimer (Xu et al. 2018), de infarto de miocardio (Boon et al. 2013) y de hipertrofia cardiaca moderada (Bernardo et al. 2014). En este sentido, y debido a que poseen funciones redundantes, la inhibición de la familia miR-34 ha resultado ser más efectiva en la recuperación de la función cardiaca (Bernardo et al. 2012). Por tanto, sería interesante analizar los niveles de miR-34b y miR-34c en el modelo murino de AP con el fin de poder establecer la inhibición de la familia miR-34 como una potencial terapia en esta EMH.

En el cerebro del modelo murino de AP hemos detectado también la sobreexpresión de miR-124-3p, miR-128-3p, miR-138-5p y miR-146a-5p. Estos miRNAs controlan aspectos esenciales para la correcta función neurológica tales como la apoptosis (Gong et al. 2016; Wang et al. 2016a), la excitabilidad neuronal (Tan et al. 2013), la morfología dendrítica (Bicker et al. 2014) y la inflamación (Su et al. 2016), respectivamente, evidenciando no solo que la apoptosis puede ser un mecanismo patológico importante en AP, tal y como se ha apuntado anteriormente, sino que también la inflamación y la actividad sináptica podrían estar alteradas y contribuir al desarrollo de las complicaciones neurológicas características de los pacientes con la enfermedad. El cerebro es una estructura altamente compartimentada en la que cada región desempeña funciones especializadas. De este modo, no solo es importante estudiar el cerebro en su conjunto sino también regiones concretas que sean de interés. En este sentido, y aunque se trate de resultados preliminares, se han detectado perfiles de miRNAs diferentes en el estriado, el hipocampo, la corteza y el cerebelo del modelo murino de AP, siendo especialmente evidente la reducción en el cerebelo de todos los miRNAs analizados. Estos resultados evidencian la afectación de regiones específicas del cerebro en el ratón AP al igual que sucede en pacientes con la enfermedad (Johnson et al. 2009; Perez-Cerda et al. 1998; Pfeifer et al. 2018). Además, dada la expresión diferencial de miRNAs, cabe la posibilidad de que los mecanismos de patogenia que subyacen la sintomatología neurológica de la AP varíen según la región del cerebro afectada.

Se desconocen los mecanismos subyacentes a la desregulación de los miRNAs como consecuencia de la deficiencia en PCC. En este contexto, se ha descrito al propionato como un inhibidor de la actividad de HDAC que, por tanto, es capaz de promover la acetilación de histonas en neuronas *in vitro* (Nguyen et al. 2007). Así, la acumulación tóxica de este metabolito como consecuencia de la deficiencia en PCC podría predisponer a una configuración abierta de la cromatina y favorecer la expresión génica de, entre otros, los miRNAs en AP. Además de a nivel epigenético, la expresión de miRNAs es un proceso altamente regulado a nivel transcripcional. Por

ejemplo, se han identificado sitios de unión para diferentes factores de transcripción en el promotor de *Mir34a*, entre ellos P53, CREB y NF- κ B (Sarkar et al. 2016). De este modo, el estrés oxidativo, la actividad neuronal y la inflamación podrían ser los responsables de la sobreexpresión de miR-34a en AP.

Una de las aplicaciones más prometedoras de los miRNAs es su uso como biomarcadores de enfermedad. La detección de miRNAs alterados en el plasma del modelo murino constituyó el punto de partida para ahondar en su posible aplicación como marcadores en AP. Nuestro estudio en el plasma de controles y de pacientes con la enfermedad ha revelado la existencia de un perfil de miRNAs específico en el que cabe resaltar la presencia de miRNAs que se encontraron también desregulados en el modelo murino, entre ellos miR-29a-5p, miR-34a-5p y miR-338-3p. Estos miRNAs se han detectado diferencialmente alterados en el plasma de los pacientes con AP a diferentes edades y condiciones (pacientes neonatales o en seguimiento), lo que podría ser relevante en el uso de dichos miRNAs como marcadores para el seguimiento de la patología. También se han confirmado cambios en los niveles de los miRNAs específicos de cerebro miR-125b-5p, miR-128-3p y miR-146a-5p en el plasma de pacientes con AP a diferentes edades.

Cabe destacar, además, la variada procedencia tisular de los miRNAs detectados en el perfil plasmático de pacientes con AP, siendo ésta fundamentalmente cerebral, cardíaca y muscular. No se han identificado en estas muestras miRNAs específicos de células sanguíneas, observación que pone en valor la fiabilidad de nuestro estudio desde el punto de vista técnico puesto que la hemólisis es una de las principales causas de la distorsión de este tipo de resultados. Por otro lado, que se hayan detectado miRNAs circulantes procedentes de cerebro, corazón y músculo podría asociarse a una liberación pasiva como consecuencia de la muerte celular o a una secreción selectiva como respuesta biológica a determinadas alteraciones de la fisiología que estén teniendo lugar en dichos órganos.

En AP existen excelentes marcadores para el diagnóstico, pero no para el seguimiento de la patología y la monitorización de la respuesta a un determinado tratamiento, lo que ha puesto de manifiesto la necesidad de definir nuevos marcadores en AP. Nuestro trabajo puede constituirse como el punto de partida para utilizar perfiles específicos de miRNAs como marcadores en esta EMH. En esta línea, se han detectado diferencias entre miRNAs plasmáticos de pacientes con AP y con AMM, resultados que sugieren la posibilidad de identificar patrones específicos de miRNAs como marcadores para cada acidemia orgánica.

CONCLUSIONES

1. El análisis estructural y funcional de nuevas variantes *missense* identificadas en *PCCA* y *PCCB* es indispensable para confirmar su efecto patogénico y para poder establecer una posible relación entre el genotipo y el fenotipo de los pacientes con AP.
2. La identificación de variantes estructurales con estabilidad reducida indica que la AP puede ser considerada en muchos casos como una enfermedad conformacional para la que el uso de chaperonas farmacológicas podría ser una terapia alternativa a investigar.
3. La disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo juegan un papel importante en la fisiopatología multiorgánica de la AP. Los estudios en el modelo murino de la enfermedad han permitido no solo profundizar en los mecanismos moleculares que subyacen el desarrollo de la patología, sino también caracterizar nuevas dianas con el fin de impulsar estrategias terapéuticas alternativas.
4. El efecto beneficioso sobre las alteraciones en la homeostasis redox y en el marcador de daño cardíaco tras el tratamiento con MitoQ y resveratrol en el modelo murino de AP supone un punto de partida para impulsar la investigación en el uso de compuestos antioxidantes como terapia adyuvante en pacientes con la enfermedad.
5. La identificación de miRNAs desregulados en el modelo murino de AP ha evidenciado su posible implicación en la fisiopatología de la enfermedad y ha abierto la posibilidad de identificar nuevas dianas terapéuticas.
6. El perfil de miRNAs plasmáticos alterados en pacientes con AP a distintas edades pone de manifiesto su potencial como biomarcadores de la enfermedad.

CONCLUSIONS

1. Structural and functional analysis of new missense variants identified in *PCCA* and *PCCB* is mandatory to confirm their pathogenic effect and to establish a potential relationship between genotype and phenotype in PA patients.
2. The identification of structural variants with reduced stability indicates that PA could be considered in most cases as a conformational disease for which pharmacological chaperones may be investigated as an alternative therapeutic strategy.
3. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress play a key role in the multiorganic pathophysiology of PA. The studies in the mouse model have provided deeper insight into the molecular mechanisms underlying disease development and have made it possible to characterize new targets which warrant the investigation of alternative therapeutic strategies.
4. The beneficial effect on redox homeostasis alterations and on the cardiac damage marker in the PA mouse model after treatment with MitoQ and resveratrol constitute the starting point to investigate the use of antioxidant compounds as an adjuvant therapy in patients with the disease.
5. The identification of deregulated miRNAs in the mouse model of PA reflects their potential involvement in the pathophysiology of the disease, paving the way for their future use as new therapeutic targets.
6. Altered miRNA signatures in plasma samples from PA patients at different ages reveal their potential use as disease biomarkers.

BIBLIOGRAFÍA

- A**dam-Vizi, V., and Tretter, L. (2013). 'The role of mitochondrial dehydrogenases in the generation of oxidative stress'. *Neurochem Int* 62: 757-763.
- Aldea, M., Clofent, J., Nunez de Arenas, C., Chamorro, M., Velasco, M., Berrendero, J. R., Navarro, C., and Cuezva, J. M. (2011). 'Reverse phase protein microarrays quantify and validate the bioenergetic signature as biomarker in colorectal cancer'. *Cancer Lett* 311: 210-218.
- Amaral, A. U., Cecatto, C., Castilho, R. F., and Wajner, M. (2016). '2-Methylcitric acid impairs glutamate metabolism and induces permeability transition in brain mitochondria'. *J Neurochem* 137: 62-75.
- Arrizza, C., De Gottardi, A., Foglia, E., Baumgartner, M., Gautschi, M., and Nuoffer, J. M. (2015). 'Reversal of cardiomyopathy in propionic acidemia after liver transplantation: a 10-year follow-up'. *Transpl Int* 28: 1447-1450.
- Aschrafi, A., Kar, A. N., Natera-Naranjo, O., MacGibeny, M. A., Gioio, A. E., and Kaplan, B. B. (2012). 'MicroRNA-338 regulates the axonal expression of multiple nuclear-encoded mitochondrial mRNAs encoding subunits of the oxidative phosphorylation machinery'. *Cell Mol Life Sci* 69: 4017-4027.
- Aschrafi, A., Schwechter, A. D., Mameza, M. G., Natera-Naranjo, O., Gioio, A. E., and Kaplan, B. B. (2008). 'MicroRNA-338 regulates local cytochrome c oxidase IV mRNA levels and oxidative phosphorylation in the axons of sympathetic neurons'. *J Neurosci* 28: 12581-12590.
- Ayala, A., Munoz, M. F., and Arguelles, S. (2014). 'Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal'. *Oxid Med Cell Longev* 2014: 360438.
- B**allhausen, D., Mittaz, L., Boulat, O., Bonafe, L., and Braissant, O. (2009). 'Evidence for catabolic pathway of propionate metabolism in CNS: expression pattern of methylmalonyl-CoA mutase and propionyl-CoA carboxylase alpha-subunit in developing and adult rat brain'. *Neuroscience* 164: 578-587.
- Bandiera, S., Ruberg, S., Girard, M., Cagnard, N., Hanein, S., Chretien, D., Munnich, A., Lyonnet, S., and Henrion-Caude, A. (2011). 'Nuclear outsourcing of RNA interference components to human mitochondria'. *PLoS One* 6: e20746.
- Baruteau, J., Hargreaves, I., Krywawych, S., Chalasani, A., Land, J. M., Davison, J. E., Kwok, M. K., Christov, G., Karimova, A., Ashworth, M., Anderson, G., Prunty, H., Rahman, S., and Grunewald, S. (2014). 'Successful reversal of propionic acidemia associated cardiomyopathy: evidence for low myocardial coenzyme Q10 status and secondary mitochondrial dysfunction as an underlying pathophysiological mechanism'. *Mitochondrion* 17: 150-156.
- Baumgartner, D., Scholl-Burgi, S., Sass, J. O., Sperl, W., Schweigmann, U., Stein, J. I., and Karall, D. (2007). 'Prolonged QTc intervals and decreased left ventricular contractility in patients with propionic acidemia'. *J Pediatr* 150: 192-197, 197 e191.

- Baumgartner, M. R., Horster, F., Dionisi-Vici, C., Haliloglu, G., Karall, D., Chapman, K. A., Huemer, M., Hochuli, M., Assoun, M., Ballhausen, D., Burlina, A., Fowler, B., Grunert, S. C., Grunewald, S., Honzik, T., Merinero, B., Perez-Cerda, C., Scholl-Burgi, S., Skovby, F., Wijburg, F., MacDonald, A., Martinelli, D., Sass, J. O., Valayannopoulos, V., and Chakrapani, A. (2014). 'Proposed guidelines for the diagnosis and management of methylmalonic and propionic acidemia'. *Orphanet J Rare Dis* 9: 130.
- Beg, M. S., Brenner, A. J., Sachdev, J., Borad, M., Kang, Y. K., Stoudemire, J., Smith, S., Bader, A. G., Kim, S., and Hong, D. S. (2017). 'Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors'. *Invest New Drugs* 35: 180-188.
- Benard, G., Faustin, B., Passerieux, E., Galinier, A., Rocher, C., Bellance, N., Delage, J. P., Casteilla, L., Letellier, T., and Rossignol, R. (2006). 'Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation'. *Am J Physiol Cell Physiol* 291: C1172-1182.
- Berman, A. Y., Motechin, R. A., Wiesenfeld, M. Y., and Holz, M. K. (2017). 'The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials'. *NPJ Precis Oncol* 1:35.
- Bernardo, B. C., Gao, X. M., Tham, Y. K., Kiriazis, H., Winbanks, C. E., Ooi, J. Y., Boey, E. J., Obad, S., Kauppinen, S., Gregorevic, P., Du, X. J., Lin, R. C., and McMullen, J. R. (2014). 'Silencing of miR-34a attenuates cardiac dysfunction in a setting of moderate, but not severe, hypertrophic cardiomyopathy'. *PLoS One* 9(2): e90337.
- Bernardo, B. C., Gao, X. M., Winbanks, C. E., Boey, E. J., Tham, Y. K., Kiriazis, H., Gregorevic, P., Obad, S., Kauppinen, S., Du, X. J., Lin, R. C., and McMullen, J. R. (2012). 'Therapeutic inhibition of the miR-34 family attenuates pathological cardiac remodeling and improves heart function'. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 17615-17620.
- Bhan, A. K., and Brody, C. (2001). 'Propionic acidemia: a rare cause of cardiomyopathy'. *Congest Heart Fail* 7: 218-219.
- Bicker, S., Lackinger, M., Weiss, K., and Schratt, G. (2014). 'MicroRNA-132, -134, and -138: a microRNA troika rules in neuronal dendrites'. *Cell Mol Life Sci* 71: 3987-4005.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., and Kalayci, O. (2012). 'Oxidative stress and antioxidant defense'. *World Allergy Organ J* 5: 9-19.
- Bodi, I., Grunert, S. C., Becker, N., Stoelzle-Feix, S., Spiekerkoetter, U., Zehender, M., Bugger, H., Bode, C., and Odening, K. E. (2016). 'Mechanisms of acquired long QT syndrome in patients with propionic acidemia'. *Heart Rhythm* 13: 1335-1345.
- Boland, M. L., Chourasia, A. H., and Macleod, K. F. (2013). 'Mitochondrial dysfunction in cancer'. *Front Oncol* 3: 292.
- Bolisetty, S., and Jaimes, E. A. (2013). 'Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology'. *Int J Mol Sci* 14: 6306-6344.

- Boon, R. A., Iekushi, K., Lechner, S., Seeger, T., Fischer, A., Heydt, S., Kaluza, D., Treguer, K., Carmona, G., Bonauer, A., Horrevoets, A. J., Didier, N., Girmatsion, Z., Biliczki, P., Ehrlich, J. R., Katus, H. A., Muller, O. J., Potente, M., Zeiher, A. M., Hermeking, H., and Dimmeler, S. (2013). 'MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function'. *Nature* 495: 107-110.
- Brasil, S., Richard, E., Jorge-Finnigan, A., Leal, F., Merinero, B., Banerjee, R., Desviat, L. R., Ugarte, M., and Perez, B. (2015). 'Methylmalonic aciduria cblB type: characterization of two novel mutations and mitochondrial dysfunction studies'. *Clin Genet* 87: 576-581.
- Brock, M., and Buckel, W. (2004). 'On the mechanism of action of the antifungal agent propionate'. *Eur J Biochem* 271: 3227-3241.
- Brunet, A., Sweeney, L. B., Sturgill, J. F., Chua, K. F., Greer, P. L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S. E., Mostoslavsky, R., Cohen, H. Y., Hu, L. S., Cheng, H. L., Jedrychowski, M. P., Gygi, S. P., Sinclair, D. A., Alt, F. W., and Greenberg, M. E. (2004). 'Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase'. *Science* 303: 2011-2015.
- Brusque, A. M., Borba Rosa, R., Schuck, P. F., Dalcin, K. B., Ribeiro, C. A., Silva, C. G., Wannmacher, C. M., Dutra-Filho, C. S., Wyse, A. T., Briones, P., and Wajner, M. (2002). 'Inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex activities in rat cerebral cortex by methylmalonic acid'. *Neurochem Int* 40: 593-601.
- Bu, H., Wedel, S., Cavinato, M., and Jansen-Durr, P. (2017). 'MicroRNA Regulation of Oxidative Stress-Induced Cellular Senescence'. *Oxid Med Cell Longev* 2017: 2398696.
- Burgoyne, J. R., Mongue-Din, H., Eaton, P., and Shah, A. M. (2012). 'Redox signaling in cardiac physiology and pathology'. *Circ Res* 111: 1091-1106.
- Cabezas-Opazo, F. A., Vergara-Pulgar, K., Perez, M. J., Jara, C., Osorio-Fuentealba, C., and Quintanilla, R. A. (2015). 'Mitochondrial Dysfunction Contributes to the Pathogenesis of Alzheimer's Disease'. *Oxid Med Cell Longev* 2015: 509654.
- Callis, T. E., Pandya, K., Seok, H. Y., Tang, R. H., Tatsuguchi, M., Huang, Z. P., Chen, J. F., Deng, Z., Gunn, B., Shumate, J., Willis, M. S., Selzman, C. H., and Wang, D. Z. (2009). 'MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice'. *J Clin Invest* 119: 2772-2786.
- Cao, D. D., Li, L., and Chan, W. Y. (2016). 'MicroRNAs: Key Regulators in the Central Nervous System and Their Implication in Neurological Diseases'. *Int J Mol Sci* 17.
- Chan, A. Y., Dolinsky, V. W., Soltys, C. L., Viollet, B., Baksh, S., Light, P. E., and Dyck, J. R. (2008). 'Resveratrol inhibits cardiac hypertrophy via AMP-activated protein kinase and Akt'. *J Biol Chem* 283: 24194-24201.
- Chandler, R. J., Chandrasekaran, S., Carrillo-Carrasco, N., Senac, J. S., Hofherr, S. E., Barry, M. A., and Venditti, C. P. (2011). 'Adeno-associated virus serotype 8 gene transfer rescues a neonatal lethal murine model of propionic acidemia'. *Hum Gene Ther* 22: 477-481.
- Chandler, R. J., Zerfas, P. M., Shanske, S., Sloan, J., Hoffmann, V., DiMauro, S., and Venditti, C. P. (2009). 'Mitochondrial dysfunction in mutant methylmalonic acidemia'. *FASEB J* 23: 1252-1261.

- Charbit-Henrion, F., Lacaille, F., McKiernan, P., Girard, M., de Lonlay, P., Valayannopoulos, V., Ottolenghi, C., Chakrapani, A., Preece, M., Sharif, K., Chardot, C., Hubert, P., and Dupic, L. (2015). 'Early and late complications after liver transplantation for propionic acidemia in children: a two centers study'. *Am J Transplant* 15: 786-791.
- Chen, W. W., Birsoy, K., Mihaylova, M. M., Snitkin, H., Stasinski, I., Yucel, B., Bayraktar, E. C., Carette, J. E., Clish, C. B., Brummelkamp, T. R., Sabatini, D. D., and Sabatini, D. M. (2014). 'Inhibition of ATP1F1 ameliorates severe mitochondrial respiratory chain dysfunction in mammalian cells'. *Cell Rep* 7: 27-34.
- Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K., and Zhang, C. Y. (2012). 'Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication'. *Trends Cell Biol* 22: 125-132.
- Cheng, X., Ku, C. H., and Siow, R. C. (2013). 'Regulation of the Nrf2 antioxidant pathway by microRNAs: New players in micromanaging redox homeostasis'. *Free Radic Biol Med* 64: 4-11.
- Childs, B., Nyhan, W. L., Borden, M., Bard, L., and Cooke, R. E. (1961). 'Idiopathic hyperglycinemia and hyperglycinuria: a new disorder of amino acid metabolism. I'. *Pediatrics* 27: 522-538.
- Chou, C. Y., Yu, L. P., and Tong, L. (2009). 'Crystal structure of biotin carboxylase in complex with substrates and implications for its catalytic mechanism'. *J Biol Chem* 284: 11690-11697.
- Chung, A. C., and Lan, H. Y. (2015). 'MicroRNAs in renal fibrosis'. *Front Physiol* 6: 50.
- Clavero, S., Martinez, M. A., Perez, B., Perez-Cerda, C., Ugarte, M., and Desviat, L. R. (2002). 'Functional characterization of PCCA mutations causing propionic acidemia'. *Biochim Biophys Acta* 1588: 119-125.
- Cocheme, H. M., Logan, A., Prime, T. A., Abakumova, I., Quin, C., McQuaker, S. J., Patel, J. V., Fearnley, I. M., James, A. M., Porteous, C. M., Smith, R. A., Hartley, R. C., Partridge, L., and Murphy, M. P. (2012). 'Using the mitochondria-targeted ratiometric mass spectrometry probe MitoB to measure H₂O₂ in living *Drosophila*'. *Nat Protoc* 7: 946-958.
- Cocheme, H. M., Quin, C., McQuaker, S. J., Cabreiro, F., Logan, A., Prime, T. A., Abakumova, I., Patel, J. V., Fearnley, I. M., James, A. M., Porteous, C. M., Smith, R. A., Saeed, S., Carre, J. E., Singer, M., Gems, D., Hartley, R. C., Partridge, L., and Murphy, M. P. (2011). 'Measurement of H₂O₂ within living *Drosophila* during aging using a ratiometric mass spectrometry probe targeted to the mitochondrial matrix'. *Cell Metab* 13: 340-350.
- Collard, R., Majtan, T., Park, I., and Kraus, J. P. (2018). 'Import of TAT-Conjugated Propionyl Coenzyme A Carboxylase Using Models of Propionic Acidemia'. *Mol Cell Biol* 38(6):e00491-17.
- Consortium, Encode Project (2012). 'An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome'. *Nature* 489: 57-74.
- Coode, F. X., Sweetman, L., and Nyhan, W. L. (1979). 'Inhibition by propionyl-coenzyme A of N-acetylglutamate synthetase in rat liver mitochondria. A possible explanation for hyperammonemia in propionic and methylmalonic acidemia'. *J Clin Invest* 64: 1544-1551.

- D**arvish-Damavandi, M., Ho, H. K., and Kang, T. S. (2016). 'Towards the development of an enzyme replacement therapy for the metabolic disorder propionic acidemia'. *Mol Genet Metab Rep* 8: 51-60.
- de Almeida, L. M., Funchal, C., Gottfried, C., Wajner, M., and Pessoa-Pureur, R. (2006). 'Propionic acid induces cytoskeletal alterations in cultured astrocytes from rat cerebral cortex'. *Metab Brain Dis* 21: 51-62.
- De Felice, B., Annunziata, A., Fiorentino, G., Borra, M., Biffali, E., Coppola, C., Cotrufo, R., Brettschneider, J., Giordana, M. L., Dalmay, T., Wheeler, G., and D'Alessandro, R. (2014). 'miR-338-3p is over-expressed in blood, CFS, serum and spinal cord from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients'. *Neurogenetics* 15: 243-253.
- De Guire, V., Robitaille, R., Tetreault, N., Guerin, R., Menard, C., Bambace, N., and Sapieha, P. (2013). 'Circulating miRNAs as sensitive and specific biomarkers for the diagnosis and monitoring of human diseases: promises and challenges'. *Clin Biochem* 46: 846-860.
- de Keyser, Y., Valayannopoulos, V., Benoist, J. F., Batteux, F., Lacaille, F., Hubert, L., Chretien, D., Chadeaux-Vekemans, B., Niaudet, P., Touati, G., Munnich, A., and de Lonlay, P. (2009). 'Multiple OXPHOS deficiency in the liver, kidney, heart, and skeletal muscle of patients with methylmalonic aciduria and propionic aciduria'. *Pediatr Res* 66: 91-95.
- de la Batie, C. D., Barbier, V., Roda, C., Brassier, A., Arnoux, J. B., Valayannopoulos, V., Guemann, A. S., Pontoizeau, C., Gobin, S., Habarou, F., Lacaille, F., Bonnefont, J. P., Canoui, P., Ottolenghi, C., De Lonlay, P., and Ouss, L. (2018). 'Autism spectrum disorders in propionic acidemia patients'. *J Inherit Metab Dis* 41: 623-629.
- Desnick, R. J., and Schuchman, E. H. (2012). 'Enzyme replacement therapy for lysosomal diseases: lessons from 20 years of experience and remaining challenges'. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 13: 307-335.
- Desviat, L. R., Perez, B., Perez-Cerda, C., Rodriguez-Pombo, P., Clavero, S., and Ugarte, M. (2004). 'Propionic acidemia: mutation update and functional and structural effects of the variant alleles'. *Mol Genet Metab* 83: 28-37.
- Desviat, L. R., Sanchez-Alcudia, R., Perez, B., Perez-Cerda, C., Navarrete, R., Vijzelaar, R., and Ugarte, M. (2009). 'High frequency of large genomic deletions in the PCCA gene causing propionic acidemia'. *Mol Genet Metab* 96: 171-176.
- Di Leva, G., Garofalo, M., and Croce, C. M. (2014). 'MicroRNAs in cancer'. *Annu Rev Pathol* 9: 287-314.
- Dini Modigliani, S., Morlando, M., Errichelli, L., Sabatelli, M., and Bozzoni, I. (2014). 'An ALS-associated mutation in the FUS 3'-UTR disrupts a microRNA-FUS regulatory circuitry'. *Nat Commun* 5: 4335.
- Dubois-Deruy, E., Cuvellez, M., Fiedler, J., Charrier, H., Mulder, P., Hebbar, E., Pfanne, A., Beseme, O., Chwastyniak, M., Amouyel, P., Richard, V., Bauters, C., Thum, T., and Pinet, F. (2017). 'MicroRNAs regulating superoxide dismutase 2 are new circulating biomarkers of heart failure'. *Sci Rep* 7: 14747.

- Duras, E., Irdem, A., and Ozkaya, O. (2017). 'Long QT syndrome diagnosed in two sisters with propionic acidemia: a case report'. *J Pediatr Endocrinol Metab* 30: 1133-1136.
- Dusl, M., Senderek, J., Muller, J. S., Vogel, J. G., Pertl, A., Stucka, R., Lochmuller, H., David, R., and Abicht, A. (2015). 'A 3'-UTR mutation creates a microRNA target site in the GFPT1 gene of patients with congenital myasthenic syndrome'. *Hum Mol Genet* 24: 3418-3426.
- E**l-Ansary, A., Al-Salem, H. S., Asma, A., and Al-Dbass, A. (2017). 'Glutamate excitotoxicity induced by orally administered propionic acid, a short chain fatty acid can be ameliorated by bee pollen'. *Lipids Health Dis* 16: 96.
- El-Hattab, A. W. (2015). 'Inborn errors of metabolism'. *Clin Perinatol* 42: 413-439, x.
- El-Hattab, A. W., and Scaglia, F. (2016). 'Mitochondrial Cardiomyopathies'. *Front Cardiovasc Med* 3: 25.
- Elpeleg, O., Miller, C., HersHKovitz, E., Bitner-Glindzicz, M., Bondi-Rubinstein, G., Rahman, S., Pagnamenta, A., Eshhar, S., and Saada, A. (2005). 'Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion'. *Am J Hum Genet* 76: 1081-1086.
- Exner, N., Lutz, A. K., Haass, C., and Winklhofer, K. F. (2012). 'Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences'. *EMBO J* 31: 3038-3062.
- F**ernandez-Vizarra, E., Enriquez, J. A., Perez-Martos, A., Montoya, J., and Fernandez-Silva, P. (2011). 'Tissue-specific differences in mitochondrial activity and biogenesis'. *Mitochondrion* 11: 207-213.
- Finkel, T. (2011). 'Signal transduction by reactive oxygen species'. *J Cell Biol* 194: 7-15.
- Forman, H. J., Davies, K. J., and Ursini, F. (2014). 'How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo'. *Free Radic Biol Med* 66: 24-35.
- Formentini, L., Pereira, M. P., Sanchez-Cenizo, L., Santacatterina, F., Lucas, J. J., Navarro, C., Martinez-Serrano, A., and Cuezva, J. M. (2014). 'In vivo inhibition of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in neurons promotes metabolic preconditioning'. *EMBO J* 33: 762-778.
- Formentini, L., Sanchez-Arago, M., Sanchez-Cenizo, L., and Cuezva, J. M. (2012). 'The mitochondrial ATPase inhibitory factor 1 triggers a ROS-mediated retrograde prosurvival and proliferative response'. *Mol Cell* 45: 731-742.
- Fourcade, S., Lopez-Erauskin, J., Ruiz, M., Ferrer, I., and Pujol, A. (2014). 'Mitochondrial dysfunction and oxidative damage cooperatively fuel axonal degeneration in X-linked adrenoleukodystrophy'. *Biochimie* 98: 143-149.
- Fragaki, K., Cano, A., Benoist, J. F., Rigal, O., Chaussonnot, A., Rouzier, C., Bannwarth, S., Caruba, C., Chabrol, B., and Paquis-Flucklinger, V. (2011). 'Fatal heart failure associated with CoQ10 and multiple OXPHOS deficiency in a child with propionic acidemia'. *Mitochondrion* 11: 533-536.

- Gallego-Villar, L. (2015). 'Estudios genéticos, fisiopatológicos y con oligonucleótidos antisentido en enfermedades neurometabólicas'. Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid.
- Gallego-Villar, L., Perez-Cerda, C., Perez, B., Abia, D., Ugarte, M., Richard, E., and Desviat, L. R. (2013). 'Functional characterization of novel genotypes and cellular oxidative stress studies in propionic acidemia'. *J Inherit Metab Dis* 36: 731-740.
- Gallego-Villar, L., Perez, B., Ugarte, M., Desviat, L. R., and Richard, E. (2014). 'Antioxidants successfully reduce ROS production in propionic acidemia fibroblasts'. *Biochem Biophys Res Commun* 452: 457-461.
- Gamez, A., Yuste-Checa, P., Brasil, S., Briso-Montiano, A., Desviat, L. R., Ugarte, M., Perez-Cerda, C., and Perez, B. (2018). 'Protein misfolding diseases: Prospects of pharmacological treatment'. *Clin Genet* 93: 450-458.
- Gane, E. J., Weilert, F., Orr, D. W., Keogh, G. F., Gibson, M., Lockhart, M. M., Frampton, C. M., Taylor, K. M., Smith, R. A., and Murphy, M. P. (2010). 'The mitochondria-targeted anti-oxidant mitoquinone decreases liver damage in a phase II study of hepatitis C patients'. *Liver Int* 30: 1019-1026.
- Ge, Y., Pan, S., Guan, D., Yin, H., Fan, Y., Liu, J., Zhang, S., Zhang, H., Feng, L., Wang, Y., Xu, R., and Yin, J. Q. (2013). 'MicroRNA-350 induces pathological heart hypertrophy by repressing both p38 and JNK pathways'. *Biochim Biophys Acta* 1832: 1-10.
- Geiger, J., and Dalgaard, L. T. (2017). 'Interplay of mitochondrial metabolism and microRNAs'. *Cell Mol Life Sci* 74: 631-646.
- Gill, J. G., Piskounova, E., and Morrison, S. J. (2016). 'Cancer, Oxidative Stress, and Metastasis'. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 81: 163-175.
- Gompertz, D., Storrs, C. N., Bau, D. C., Peters, T. J., and Hughes, E. A. (1970). 'Localisation of enzymic defect in propionicacidemia'. *Lancet* 1: 1140-1143.
- Gong, X., Wang, H., Ye, Y., Shu, Y., Deng, Y., He, X., Lu, G., and Zhang, S. (2016). 'miR-124 regulates cell apoptosis and autophagy in dopaminergic neurons and protects them by regulating AMPK/mTOR pathway in Parkinson's disease'. *Am J Transl Res* 8: 2127-2137.
- Graham, D., Huynh, N. N., Hamilton, C. A., Beattie, E., Smith, R. A., Cocheme, H. M., Murphy, M. P., and Dominiczak, A. F. (2009). 'Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ10 improves endothelial function and attenuates cardiac hypertrophy'. *Hypertension* 54: 322-328.
- Grunert, S. C., Mullerleile, S., De Silva, L., Barth, M., Walter, M., Walter, K., Meissner, T., Lindner, M., Ensenauer, R., Santer, R., Bodamer, O. A., Baumgartner, M. R., Brunner-Krainz, M., Karall, D., Haase, C., Knerr, I., Marquardt, T., Hennermann, J. B., Steinfeld, R., Beblo, S., Koch, H. G., Konstantopoulou, V., Scholl-Burgi, S., van Teeffelen-Heithoff, A., Suormala, T., Sperl, W., Kraus, J. P., Superti-Furga, A., Schwab, K. O., and Sass, J. O. (2013). 'Propionic acidemia: clinical course and outcome in 55 pediatric and adolescent patients'. *Orphanet J Rare Dis* 8: 6.

- Guenzel, A. J., Hillestad, M. L., Matern, D., and Barry, M. A. (2014). 'Effects of adeno-associated virus serotype and tissue-specific expression on circulating biomarkers of propionic acidemia'. *Hum Gene Ther* 25: 837-843.
- Guenzel, A. J., Hofherr, S. E., Hillestad, M., Barry, M., Weaver, E., Venezia, S., Kraus, J. P., Matern, D., and Barry, M. A. (2013). 'Generation of a hypomorphic model of propionic acidemia amenable to gene therapy testing'. *Mol Ther* 21: 1316-1323.
- H**a, M., and Kim, V. N. (2014). 'Regulation of microRNA biogenesis'. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 509-524.
- Hassanpour, S. H., Dehghani, M. A., and Karami, S. Z. (2018). 'Study of respiratory chain dysfunction in heart disease'. *J Cardiovasc Thorac Res* 10: 1-13.
- Hayasaka, K., Narisawa, K., Satoh, T., Tateda, H., Metoki, K., Tada, K., Hiraga, K., Aoki, T., Kawakami, T., Akamatsu, H., and Matsuo, N. (1982). 'Glycine cleavage system in ketotic hyperglycinemia: a reduction of H-protein activity'. *Pediatr Res* 16: 5-7.
- Hayashi, G., and Cortopassi, G. (2015). 'Oxidative stress in inherited mitochondrial diseases'. *Free Radic Biol Med* 88: 10-17.
- Hayes, J. D., and Dinkova-Kostova, A. T. (2014). 'The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism'. *Trends Biochem Sci* 39: 199-218.
- He, F., and Zuo, L. (2015). 'Redox Roles of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Diseases'. *Int J Mol Sci* 16: 27770-27780.
- Hernsdorff, H. H., Barbosa, K. B., Volp, A. C., Puchau, B., Bressan, J., Zulet, M. A., and Martinez, J. A. (2012). 'Vitamin C and fibre consumption from fruits and vegetables improves oxidative stress markers in healthy young adults'. *Br J Nutr* 107: 1119-1127.
- Hernandez-Rapp, J., Rainone, S., Goupil, C., Dorval, V., Smith, P. Y., Saint-Pierre, M., Vallee, M., Planel, E., Droit, A., Calon, F., Cicchetti, F., and Hebert, S. S. (2016). 'microRNA-132/212 deficiency enhances A β production and senile plaque deposition in Alzheimer's disease triple transgenic mice'. *Sci Rep* 6: 30953.
- Hofherr, S. E., Senac, J. S., Chen, C. Y., Palmer, D. J., Ng, P., and Barry, M. A. (2009). 'Short-term rescue of neonatal lethality in a mouse model of propionic acidemia by gene therapy'. *Hum Gene Ther* 20: 169-180.
- Holt, E. M., Steffen, L. M., Moran, A., Basu, S., Steinberger, J., Ross, J. A., Hong, C. P., and Sinaiko, A. R. (2009). 'Fruit and vegetable consumption and its relation to markers of inflammation and oxidative stress in adolescents'. *J Am Diet Assoc* 109: 414-421.
- Hsia, Y. E., Scully, K. J., and Rosenberg, L. E. (1969). 'Defective propionate carboxylation in ketotic hyperglycinaemia'. *Lancet* 1: 757-758.
- Hsia, Y. E., Scully, K. J., and Rosenberg, L. E. (1971). 'Inherited propionyl-CoA carboxylase deficiency in "ketotic hyperglycinemia"'. *J Clin Invest* 50: 127-130.
- Huang, C. S., Sadre-Bazzaz, K., Shen, Y., Deng, B., Zhou, Z. H., and Tong, L. (2010). 'Crystal structure of the $\alpha(6)\beta(6)$ holoenzyme of propionyl-coenzyme A carboxylase'. *Nature* 466: 1001-1005.

- Ianchulev, T., Kolin, T., Moseley, K., and Sadun, A. (2003). 'Optic nerve atrophy in propionic acidemia'. *Ophthalmology* 110: 1850-1854.
- Imbard, A., Garcia Segarra, N., Tardieu, M., Broue, P., Bouchereau, J., Pichard, S., de Baulny, H. O., Slama, A., Mussini, C., Touati, G., Danjoux, M., Gaignard, P., Vogel, H., Labarthe, F., Schiff, M., and Benoist, J. F. (2018). 'Long-term liver disease in methylmalonic and propionic acidemias'. *Mol Genet Metab* 123: 433-440.
- Iorio, M. V., Ferracin, M., Liu, C. G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., Menard, S., Palazzo, J. P., Rosenberg, A., Musiani, P., Volinia, S., Nenci, I., Calin, G. A., Querzoli, P., Negrini, M., and Croce, C. M. (2005). 'MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer'. *Cancer Res* 65: 7065-7070.
- Jafari, P., Braissant, O., Zavadakova, P., Henry, H., Bonafe, L., and Ballhausen, D. (2013). 'Brain damage in methylmalonic aciduria: 2-methylcitrate induces cerebral ammonium accumulation and apoptosis in 3D organotypic brain cell cultures'. *Orphanet J Rare Dis* 8: 4.
- Johnson, J. A., Le, K. L., and Palacios, E. (2009). 'Propionic acidemia: case report and review of neurologic sequelae'. *Pediatr Neurol* 40: 317-320.
- Jonas, S., and Izaurralde, E. (2015). 'Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing'. *Nat Rev Genet* 16: 421-433.
- Kabaria, S., Choi, D. C., Chaudhuri, A. D., Mouradian, M. M., and Junn, E. (2015). 'Inhibition of miR-34b and miR-34c enhances alpha-synuclein expression in Parkinson's disease'. *FEBS Lett* 589: 319-325.
- Karatas, O. F., Guzel, E., Karaca, E., Sevlı, S., Soyucen, E., Yuksel, A., and Ozen, M. (2013). 'MicroRNA profiling in lymphocytes and serum of tyrosinemia type-I patients'. *Mol Biol Rep* 40: 4619-4623.
- Kasai, A., Kakiyama, S., Miura, H., Okada, R., Hayata-Takano, A., Hazama, K., Niu, M., Shintani, N., Nakazawa, T., and Hashimoto, H. (2016). 'Double In situ Hybridization for MicroRNAs and mRNAs in Brain Tissues'. *Front Mol Neurosci* 9: 126.
- Kelson, T. L., Ohura, T., and Kraus, J. P. (1996). 'Chaperonin-mediated assembly of wild-type and mutant subunits of human propionyl-CoA carboxylase expressed in Escherichia coli'. *Hum Mol Genet* 5: 331-337.
- Kerr, L. E., McGregor, A. L., Amet, L. E., Asada, T., Spratt, C., Allsopp, T. E., Harmar, A. J., Shen, S., Carlson, G., Logan, N., Kelly, J. S., and Sharkey, J. (2004). 'Mice overexpressing human caspase 3 appear phenotypically normal but exhibit increased apoptosis and larger lesion volumes in response to transient focal cerebral ischaemia'. *Cell Death Differ* 11: 1102-1111.
- Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S. D. (2003). 'Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias'. *Cell* 115: 209-216.

- Kim, D., Nguyen, M. D., Dobbin, M. M., Fischer, A., Sananbenesi, F., Rodgers, J. T., Delalle, I., Baur, J. A., Sui, G., Armour, S. M., Puigserver, P., Sinclair, D. A., and Tsai, L. H. (2007). 'SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis'. *EMBO J* 26: 3169-3179.
- Kim, V. N. (2005). 'MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing'. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 376-385.
- Kolvraa, S. (1979). 'Inhibition of the glycine cleavage system by branched-chain amino acid metabolites'. *Pediatr Res* 13: 889-893.
- Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., and Ochiya, T. (2010). 'Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells'. *J Biol Chem* 285: 17442-17452.
- Laemmle, A., Balmer, C., Doell, C., Sass, J. O., Haberle, J., and Baumgartner, M. R. (2014). 'Propionic acidemia in a previously healthy adolescent with acute onset of dilated cardiomyopathy'. *Eur J Pediatr* 173: 971-974.
- Larosa, V., and Remacle, C. (2018). 'Insights into the respiratory chain and oxidative stress'. *Biosci Rep* 38 BSR20171492.
- Lau, P., Bossers, K., Janky, R., Salta, E., Frigerio, C. S., Barbash, S., Rothman, R., Sierksma, A. S., Thathiah, A., Greenberg, D., Papadopoulou, A. S., Achsel, T., Ayoubi, T., Soreq, H., Verhaagen, J., Swaab, D. F., Aerts, S., and De Strooper, B. (2013). 'Alteration of the microRNA network during the progression of Alzheimer's disease'. *EMBO Mol Med* 5: 1613-1634.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. (1993). 'The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*'. *Cell* 75: 843-854.
- Lee, T. M., Addonizio, L. J., Barshop, B. A., and Chung, W. K. (2009). 'Unusual presentation of propionic acidemia as isolated cardiomyopathy'. *J Inherit Metab Dis* 32 Suppl 1: S97-101.
- Li, Y., Peng, T., Li, L., Wang, X., Duan, R., Gao, H., Guan, W., Lu, J., Teng, J., and Jia, Y. (2014a). 'MicroRNA-9 regulates neural apoptosis in methylmalonic acidemia via targeting BCL2L11'. *Int J Dev Neurosci* 36: 19-24.
- Li, Y., Peng, T., Wang, X., Duan, R., Gao, H., Guan, W., Teng, J., and Jia, Y. (2014b). 'A Primary Study on Down-Regulated miR-9-1 and Its Biological Significances in Methylmalonic Acidemia'. *J Mol Neurosci* 53: 280-286.
- Logan, A., Shabalina, I. G., Prime, T. A., Rogatti, S., Kalinovich, A. V., Hartley, R. C., Budd, R. C., Cannon, B., and Murphy, M. P. (2014). 'In vivo levels of mitochondrial hydrogen peroxide increase with age in mtDNA mutator mice'. *Aging Cell* 13: 765-768.
- Longo, N., Price, L. B., Gappmaier, E., Cantor, N. L., Ernst, S. L., Bailey, C., and Pasquali, M. (2017). 'Anaplerotic therapy in propionic acidemia'. *Mol Genet Metab* 122: 51-59.
- Lopez-Erauskin, J., Galino, J., Bianchi, P., Fourcade, S., Andreu, A. L., Ferrer, I., Munoz-Pinedo, C., and Pujol, A. (2012). 'Oxidative stress modulates mitochondrial failure and cyclophilin D function in X-linked adrenoleukodystrophy'. *Brain* 135: 3584-3598.

- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., Downing, J. R., Jacks, T., Horvitz, H. R., and Golub, T. R. (2005). 'MicroRNA expression profiles classify human cancers'. *Nature* 435: 834-838.
- M**acFabe, D. F., Cain, D. P., Rodriguez-Capote, K., Franklin, A. E., Hoffman, J. E., Boon, F., Taylor, A. R., Kavaliers, M., and Ossenkopp, K. P. (2007). 'Neurobiological effects of intraventricular propionic acid in rats: possible role of short chain fatty acids on the pathogenesis and characteristics of autism spectrum disorders'. *Behav Brain Res* 176: 149-169.
- MacFabe, D. F., Cain, N. E., Boon, F., Ossenkopp, K. P., and Cain, D. P. (2011). 'Effects of the enteric bacterial metabolic product propionic acid on object-directed behavior, social behavior, cognition, and neuroinflammation in adolescent rats: Relevance to autism spectrum disorder'. *Behav Brain Res* 217: 47-54.
- Mailloux, R. J., McBride, S. L., and Harper, M. E. (2013). 'Unearthing the secrets of mitochondrial ROS and glutathione in bioenergetics'. *Trends Biochem Sci* 38: 592-602.
- Marcuzzo, S., Bonanno, S., Kapetis, D., Barzago, C., Cavalcante, P., D'Alessandro, S., Mantegazza, R., and Bernasconi, P. (2015). 'Up-regulation of neural and cell cycle-related microRNAs in brain of amyotrophic lateral sclerosis mice at late disease stage'. *Mol Brain* 8: 5.
- Mardach, R., Verity, M. A., and Cederbaum, S. D. (2005). 'Clinical, pathological, and biochemical studies in a patient with propionic acidemia and fatal cardiomyopathy'. *Mol Genet Metab* 85: 286-290.
- Martin, M. A., Blazquez, A., Gutierrez-Solana, L. G., Fernandez-Moreira, D., Briones, P., Andreu, A. L., Garesse, R., Campos, Y., and Arenas, J. (2005). 'Leigh syndrome associated with mitochondrial complex I deficiency due to a novel mutation in the NDUFS1 gene'. *Arch Neurol* 62: 659-661.
- Martinez, B., del Hoyo, P., Martin, M. A., Arenas, J., Perez-Castillo, A., and Santos, A. (2001). 'Thyroid hormone regulates oxidative phosphorylation in the cerebral cortex and striatum of neonatal rats'. *J Neurochem* 78: 1054-1063.
- Mc Guire, P. J., Parikh, A., and Diaz, G. A. (2009). 'Profiling of oxidative stress in patients with inborn errors of metabolism'. *Mol Genet Metab* 98: 173-180.
- Medina, S., Dominguez-Perles, R., Cejuela-Anta, R., Villano, D., Martinez-Sanz, J. M., Gil, P., Garcia-Viguera, C., Ferreres, F., Gil, J. I., and Gil-Izquierdo, A. (2012a). 'Assessment of oxidative stress markers and prostaglandins after chronic training of triathletes'. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 99: 79-86.
- Medina, S., Dominguez-Perles, R., Gil, J. I., Ferreres, F., Garcia-Viguera, C., Martinez-Sanz, J. M., and Gil-Izquierdo, A. (2012b). 'A ultra-pressure liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry method for the analysis of 13 eicosanoids in human urine and quantitative 24 hour values in healthy volunteers in a controlled constant diet'. *Rapid Commun Mass Spectrom* 26: 1249-1257.

- Mencia, A., Modamio-Hoybjor, S., Redshaw, N., Morin, M., Mayo-Merino, F., Olavarrieta, L., Aguirre, L. A., del Castillo, I., Steel, K. P., Dalmay, T., Moreno, F., and Moreno-Pelayo, M. A. (2009). 'Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyndromic progressive hearing loss'. *Nat Genet* 41: 609-613.
- Mersey, B. D., Jin, P., and Danner, D. J. (2005). 'Human microRNA (miR29b) expression controls the amount of branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex in a cell'. *Hum Mol Genet* 14: 3371-3377.
- Miller, A. F. (2012). 'Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights'. *FEBS Lett* 586: 585-595.
- Milne, G. L., Gao, B., Terry, E. S., Zackert, W. E., and Sanchez, S. C. (2013). 'Measurement of F2- isoprostanes and isofurans using gas chromatography-mass spectrometry'. *Free Radic Biol Med* 59: 36-44.
- Minones-Moyano, E., Porta, S., Escaramis, G., Rabionet, R., Iraola, S., Kagerbauer, B., Espinosa-Parrilla, Y., Ferrer, I., Estivill, X., and Marti, E. (2011). 'MicroRNA profiling of Parkinson's disease brains identifies early downregulation of miR-34b/c which modulate mitochondrial function'. *Hum Mol Genet* 20: 3067-3078.
- Miquel, E., Cassina, A., Martinez-Palma, L., Souza, J. M., Bolatto, C., Rodriguez-Bottero, S., Logan, A., Smith, R. A., Murphy, M. P., Barbeito, L., Radi, R., and Cassina, P. (2014). 'Neuroprotective effects of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis'. *Free Radic Biol Med* 70: 204-213.
- Miyazaki, T., Ohura, T., Kobayashi, M., Shigematsu, Y., Yamaguchi, S., Suzuki, Y., Hata, I., Aoki, Y., Yang, X., Minjares, C., Haruta, I., Uto, H., Ito, Y., and Muller, U. (2001). 'Fatal propionic acidemia in mice lacking propionyl-CoA carboxylase and its rescue by postnatal, liver-specific supplementation via a transgene'. *J Biol Chem* 276: 35995-35999.
- Mochalkin, I., Miller, J. R., Evdokimov, A., Lightle, S., Yan, C., Stover, C. K., and Waldrop, G. L. (2008). 'Structural evidence for substrate-induced synergism and half-sites reactivity in biotin carboxylase'. *Protein Sci* 17: 1706-1718.
- Moita, E., Gil-Izquierdo, A., Sousa, C., Ferreres, F., Silva, L. R., Valentao, P., Dominguez-Perles, R., Baenas, N., and Andrade, P. B. (2013). 'Integrated analysis of COX-2 and iNOS derived inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW macrophages pre-exposed to Echium plantagineum L. bee pollen extract'. *PLoS One* 8: e59131.
- Morato, L., Ruiz, M., Boada, J., Calingasan, N. Y., Galino, J., Guilera, C., Jove, M., Naudi, A., Ferrer, I., Pamplona, R., Serrano, M., Portero-Otin, M., Beal, M. F., Fourcade, S., and Pujol, A. (2015). 'Activation of sirtuin 1 as therapy for the peroxisomal disease adrenoleukodystrophy'. *Cell Death Differ* 22: 1742-1753.
- Morava, E., Rahman, S., Peters, V., Baumgartner, M. R., Patterson, M., and Zschocke, J. (2015). 'Quo vadis: the re-definition of "inborn metabolic diseases"'. *J Inherit Metab Dis* 38: 1003-1006.
- Morland, C., Froland, A. S., Pettersen, M. N., Storm-Mathisen, J., Gundersen, V., Rise, F., and Hassel, B. (2018). 'Propionate enters GABAergic neurons, inhibits GABA transaminase, causes GABA accumulation and lethargy in a model of propionic acidemia'. *Biochem J* 475: 749-758.

- Mudo, G., Makela, J., Di Liberto, V., Tselykh, T. V., Olivieri, M., Piepponen, P., Eriksson, O., Malkia, A., Bonomo, A., Kairisalo, M., Aguirre, J. A., Korhonen, L., Belluardo, N., and Lindholm, D. (2012). 'Transgenic expression and activation of PGC-1alpha protect dopaminergic neurons in the MPTP mouse model of Parkinson's disease'. *Cell Mol Life Sci* 69: 1153-1165.
- Muro, S., Perez, B., Rodriguez-Pombo, P., Desviat, L. R., Perez-Cerda, C., and Ugarte, M. (2000). 'Mutations affecting the beta-beta homomeric interaction in propionic acidemia: an approach to the determination of the beta-propionyl-CoA carboxylase functional domains'. *J Inherit Metab Dis* 23: 300-304.
- Murphy, M. P. (2008). 'Targeting lipophilic cations to mitochondria'. *Biochim Biophys Acta* 1777: 1028-1031.
- Murphy, M. P. (2009). 'How mitochondria produce reactive oxygen species'. *Biochem J* 417: 1-13.
- N**agao, M., Tanaka, T., Morii, M., Wakai, S., Horikawa, R., and Kasahara, M. (2013). 'Improved neurologic prognosis for a patient with propionic acidemia who received early living donor liver transplantation'. *Mol Genet Metab* 108: 25-29.
- Nagaraj, S., Laskowska-Kaszub, K., Debski, K. J., Wojsiat, J., Dabrowski, M., Gabryelewicz, T., Kuznicki, J., and Wojda, U. (2017). 'Profile of 6 microRNA in blood plasma distinguish early stage Alzheimer's disease patients from non-demented subjects'. *Oncotarget* 8: 16122-16143.
- Navarro-Yepes, J., Burns, M., Anandhan, A., Khalimonchuk, O., del Razo, L. M., Quintanilla-Vega, B., Pappa, A., Panayiotidis, M. I., and Franco, R. (2014). 'Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival'. *Antioxid Redox Signal* 21: 66-85.
- Nemoto, S., Fergusson, M. M., and Finkel, T. (2005). 'SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1{alpha}'. *J Biol Chem* 280: 16456-16460.
- Nguyen, N. H., Morland, C., Gonzalez, S. V., Rise, F., Storm-Mathisen, J., Gundersen, V., and Hassel, B. (2007). 'Propionate increases neuronal histone acetylation, but is metabolized oxidatively by glia. Relevance for propionic acidemia'. *J Neurochem* 101: 806-814.
- Nielsen, K. B., Sorensen, S., Cartegni, L., Corydon, T. J., Doktor, T. K., Schroeder, L. D., Reinert, L. S., Elpeleg, O., Krainer, A. R., Gregersen, N., Kjems, J., and Andresen, B. S. (2007). 'Seemingly neutral polymorphic variants may confer immunity to splicing-inactivating mutations: a synonymous SNP in exon 5 of MCAD protects from deleterious mutations in a flanking exonic splicing enhancer'. *Am J Hum Genet* 80: 416-432.
- Nishino, H., Hida, H., Kumazaki, M., Shimano, Y., Nakajima, K., Shimizu, H., Ooiwa, T., and Baba, H. (2000). 'The striatum is the most vulnerable region in the brain to mitochondrial energy compromise: a hypothesis to explain its specific vulnerability'. *J Neurotrauma* 17: 251-260.

- Nizon, M., Ottolenghi, C., Valayannopoulos, V., Arnoux, J. B., Barbier, V., Habarou, F., Desguerre, I., Boddaert, N., Bonnefont, J. P., Acquaviva, C., Benoist, J. F., Rabier, D., Touati, G., and de Lonlay, P. (2013). 'Long-term neurological outcome of a cohort of 80 patients with classical organic acidurias'. *Orphanet J Rare Dis* 8: 148.
- Nunnari, J., and Suomalainen, A. (2012). 'Mitochondria: in sickness and in health'. *Cell* 148: 1145-1159.
- Nyhan, W. L., Borden, M., and Childs, B. (1961). 'Idiopathic hyperglycinemia: a new disorder of amino acid metabolism. II. The concentrations of other amino acids in the plasma and their modification by the administration of leucine'. *Pediatrics* 27: 539-550.
- Olsen, R. K., Broner, S., Sabaratnam, R., Doktor, T. K., Andersen, H. S., Bruun, G. H., Gahrn, B., Stenbroen, V., Olpin, S. E., Dobbie, A., Gregersen, N., and Andresen, B. S. (2014). 'The ETFDH c.158A>G variation disrupts the balanced interplay of ESE- and ESS-binding proteins thereby causing missplicing and multiple Acyl-CoA dehydrogenation deficiency'. *Hum Mutat* 35: 86-95.
- Olsen, R. K., Cornelius, N., and Gregersen, N. (2015). 'Redox signalling and mitochondrial stress responses; lessons from inborn errors of metabolism'. *J Inherit Metab Dis* 38: 703-719.
- Oyarzabal, A., Bravo-Alonso, I., Sanchez-Arago, M., Rejas, M. T., Merinero, B., Garcia-Cazorla, A., Artuch, R., Ugarte, M., and Rodriguez-Pombo, P. (2016). 'Mitochondrial response to the BCKDK-deficiency: Some clues to understand the positive dietary response in this form of autism'. *Biochim Biophys Acta* 1862: 592-600.
- Ozsait, B., Komurcu-Bayrak, E., Levula, M., Erginel-Unaltuna, N., Kahonen, M., Rai, M., Lehtimäki, T., and Laaksonen, R. (2010). 'Niemann-Pick type C fibroblasts have a distinct microRNA profile related to lipid metabolism and certain cellular components'. *Biochem Biophys Res Commun* 403: 316-321.
- Parone, P. A., Da Cruz, S., Tondera, D., Mattenberger, Y., James, D. I., Maechler, P., Barja, F., and Martinou, J. C. (2008). 'Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA'. *PLoS One* 3: e3257.
- Pena, L., and Burton, B. K. (2012a). 'Survey of health status and complications among propionic acidemia patients'. *Am J Med Genet A* 158A: 1641-1646.
- Pena, L., Franks, J., Chapman, K. A., Gropman, A., Ah Mew, N., Chakrapani, A., Island, E., MacLeod, E., Matern, D., Smith, B., Stagni, K., Sutton, V. R., Ueda, K., Urv, T., Venditti, C., Enns, G. M., and Summar, M. L. (2012b). 'Natural history of propionic acidemia'. *Mol Genet Metab* 105: 5-9.
- Perez-Cerda, C., Clavero, S., Perez, B., Rodriguez-Pombo, P., Desviat, L. R., and Ugarte, M. (2003). 'Functional analysis of PCCB mutations causing propionic acidemia based on expression studies in deficient human skin fibroblasts'. *Biochim Biophys Acta* 1638: 43-49.

- Perez-Cerda, C., Merinero, B., Marti, M., Cabrera, J. C., Pena, L., Garcia, M. J., Gangoiti, J., Sanz, P., Rodriguez-Pombo, P., Hoenicka, J., Richard, E., Muro, S., and Ugarte, M. (1998). 'An unusual late-onset case of propionic acidemia: biochemical investigations, neuroradiological findings and mutation analysis'. *Eur J Pediatr* 157: 50-52.
- Perez, B., Desviat, L. R., Rodriguez-Pombo, P., Clavero, S., Navarrete, R., Perez-Cerda, C., and Ugarte, M. (2003). 'Propionic acidemia: identification of twenty-four novel mutations in Europe and North America'. *Mol Genet Metab* 78: 59-67.
- Perfetti, A., Greco, S., Cardani, R., Fossati, B., Cuomo, G., Valaperta, R., Ambroggi, F., Cortese, A., Botta, A., Mignarri, A., Santoro, M., Gaetano, C., Costa, E., Dotti, M. T., Silvestri, G., Massa, R., Meola, G., and Martelli, F. (2017). 'Erratum: Validation of plasma microRNAs as biomarkers for myotonic dystrophy type 1'. *Sci Rep* 7: 43074.
- Pettenuzzo, L. F., Schuck, P. F., Wyse, A. T., Wannmacher, C. M., Dutra-Filho, C. S., Netto, C. A., and Wajner, M. (2003). 'Ascorbic acid prevents water maze behavioral deficits caused by early postnatal methylmalonic acid administration in the rat'. *Brain Res* 976: 234-242.
- Pfeifer, C. M., Van Tassel, D. C., and Miller, J. H. (2018). 'Unique neuroradiological findings in propionic acidemia'. *Radiol Case Rep* 13: 1207-1211.
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J., and Valko, M. (2017). 'Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases'. *Trends Pharmacol Sci* 38: 592-607.
- Powell, C. L., Swenberg, J. A., and Rusyn, I. (2005). 'Expression of base excision DNA repair genes as a biomarker of oxidative DNA damage'. *Cancer Lett* 229: 1-11.
- Preissler, T., Bristot, I. J., Costa, B. M., Fernandes, E. K., Rieger, E., Bortoluzzi, V. T., de Franceschi, I. D., Dutra-Filho, C. S., Moreira, J. C., and Wannmacher, C. M. (2016). 'Phenylalanine induces oxidative stress and decreases the viability of rat astrocytes: possible relevance for the pathophysiology of neurodegeneration in phenylketonuria'. *Metab Brain Dis* 31: 529-537.
- Quintero, J., Molera, C., Juamperez, J., Redecillas, S., Meavilla, S., Nunez, R., Garcia, C., Del Toro, M., Garcia, A., Ortega, J., Segarra, O., Martin de Carpi, J., Bilbao, I., and Charco, R. (2018). 'The role of liver transplantation in propionic acidemia'. *Liver Transpl* 24:1736-1745.
- Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, E. N., Lakshminarasaiah, U., Gopas, J., and Nishigaki, I. (2014). 'Antioxidants and human diseases'. *Clin Chim Acta* 436: 332-347.
- Reynolds, R. H., Petersen, M. H., Willert, C. W., Heinrich, M., Nymann, N., Dall, M., Treebak, J. T., Bjorkqvist, M., Silahtaroglu, A., Hasholt, L., and Norremolle, A. (2018). 'Perturbations in the p53/miR-34a/SIRT1 pathway in the R6/2 Huntington's disease model'. *Mol Cell Neurosci* 88: 118-129.

- Ribeiro Junior, R. F., Dabkowski, E. R., Shekar, K. C., KA, O. Connell, Hecker, P. A., and Murphy, M. P. (2018). 'MitoQ improves mitochondrial dysfunction in heart failure induced by pressure overload'. *Free Radic Biol Med* 117: 18-29.
- Richard, E., Alvarez-Barrientos, A., Perez, B., Desviat, L. R., and Ugarte, M. (2007). 'Methylmalonic acidemia leads to increased production of reactive oxygen species and induction of apoptosis through the mitochondrial/caspase pathway'. *J Pathol* 213: 453-461.
- Rigo, F. K., Pasquetti, L., Malfatti, C. R., Figuera, M. R., Coelho, R. C., Petri, C. Z., and Mello, C. F. (2006). 'Propionic acid induces convulsions and protein carbonylation in rats'. *Neurosci Lett* 408: 151-154.
- Rincon, A., Aguado, C., Desviat, L. R., Sanchez-Alcudia, R., Ugarte, M., and Perez, B. (2007). 'Propionic and methylmalonic acidemia: antisense therapeutics for intronic variations causing aberrantly spliced messenger RNA'. *Am J Hum Genet* 81: 1262-1270.
- Rodriguez-Cuenca, S., Cocheme, H. M., Logan, A., Abakumova, I., Prime, T. A., Rose, C., Vidal-Puig, A., Smith, A. C., Rubinsztein, D. C., Fearnley, I. M., Jones, B. A., Pope, S., Heales, S. J., Lam, B. Y., Neogi, S. G., McFarlane, I., James, A. M., Smith, R. A., and Murphy, M. P. (2010). 'Consequences of long-term oral administration of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ to wild-type mice'. *Free Radic Biol Med* 48: 161-172.
- Roe, C. R., Millington, D. S., Maltby, D. A., Bohan, T. P., and Hoppel, C. L. (1984). 'L-carnitine enhances excretion of propionyl coenzyme A as propionylcarnitine in propionic acidemia'. *J Clin Invest* 73: 1785-1788.
- Rokavec, M., Li, H., Jiang, L., and Hermeking, H. (2014). 'The p53/miR-34 axis in development and disease'. *J Mol Cell Biol* 6: 214-230.
- Romano, S., Valayannopoulos, V., Touati, G., Jais, J. P., Rabier, D., de Keyser, Y., Bonnet, D., and de Lonlay, P. (2010). 'Cardiomyopathies in propionic aciduria are reversible after liver transplantation'. *J Pediatr* 156: 128-134.
- Rottiers, V., and Naar, A. M. (2012). 'MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders'. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 239-250.
- Rupaimoole, R., and Slack, F. J. (2017). 'MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases'. *Nat Rev Drug Discov* 16: 203-222.
- S**anchez-Alcudia, R., Perez, B., Perez-Cerda, C., Ugarte, M., and Desviat, L. R. (2011). 'Overexpression of adapted U1snRNA in patients' cells to correct a 5' splice site mutation in propionic acidemia'. *Mol Genet Metab* 102: 134-138.
- Sanchez-Arago, M., Garcia-Bermudez, J., Martinez-Reyes, I., Santacatterina, F., and Cuezva, J. M. (2013). 'Degradation of IF1 controls energy metabolism during osteogenic differentiation of stem cells'. *EMBO Rep* 14: 638-644.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). 'DNA sequencing with chain-terminating inhibitors'. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.

- Santacatterina, F., Chamorro, M., de Arenas, C. N., Navarro, C., Martin, M. A., Cuezva, J. M., and Sanchez-Arago, M. (2015). 'Quantitative analysis of proteins of metabolism by reverse phase protein microarrays identifies potential biomarkers of rare neuromuscular diseases'. *J Transl Med* 13: 65.
- Santacatterina, F., Torresano, L., Nunez-Salgado, A., Esparza-Molto, P. B., Olive, M., Gallardo, E., Garcia-Arumi, E., Blazquez, A., Gonzalez-Quintana, A., Martin, M. A., and Cuezva, J. M. (2018). 'Different mitochondrial genetic defects exhibit the same protein signature of metabolism in skeletal muscle of PEO and MELAS patients: A role for oxidative stress'. *Free Radic Biol Med* 126: 235-248.
- Sarkar, S., Jun, S., Rellick, S., Quintana, D. D., Cavendish, J. Z., and Simpkins, J. W. (2016). 'Expression of microRNA-34a in Alzheimer's disease brain targets genes linked to synaptic plasticity, energy metabolism, and resting state network activity'. *Brain Res* 1646: 139-151.
- Scaini, G., Teodorak, B. P., Jeremias, I. C., Morais, M. O., Mina, F., Dominguni, D., Pescador, B., Comim, C. M., Schuck, P. F., Ferreira, G. C., Quevedo, J., and Streck, E. L. (2012). 'Antioxidant administration prevents memory impairment in an animal model of maple syrup urine disease'. *Behav Brain Res* 231: 92-96.
- Schmidt, H. H., Stocker, R., Vollbracht, C., Paulsen, G., Riley, D., Daiber, A., and Cuadrado, A. (2015). 'Antioxidants in Translational Medicine'. *Antioxid Redox Signal* 23: 1130-1143.
- Schreiber, J., Chapman, K. A., Summar, M. L., Ah Mew, N., Sutton, V. R., MacLeod, E., Stagni, K., Ueda, K., Franks, J., Island, E., Matern, D., Pena, L., Smith, B., Urv, T., Venditti, C., Chakarapani, A., and Gropman, A. L. (2012). 'Neurologic considerations in propionic acidemia'. *Mol Genet Metab* 105: 10-15.
- Schwab, M. A., Sauer, S. W., Okun, J. G., Nijtmans, L. G., Rodenburg, R. J., van den Heuvel, L. P., Droese, S., Brandt, U., Hoffmann, G. F., Ter Laak, H., Kolker, S., and Smeitink, J. A. (2006). 'Secondary mitochondrial dysfunction in propionic aciduria: a pathogenic role for endogenous mitochondrial toxins'. *Biochem J* 398: 107-112.
- Schwienbacher, C., Foco, L., Picard, A., Corradi, E., Serafin, A., Panzer, J., Zanigni, S., Blankenburg, H., Facheris, M. F., Giannini, G., Falla, M., Cortelli, P., Pramstaller, P. P., and Hicks, A. A. (2017). 'Plasma and White Blood Cells Show Different miRNA Expression Profiles in Parkinson's Disease'. *J Mol Neurosci* 62: 244-254.
- Sempere, L. F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., and Ambros, V. (2004). 'Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation'. *Genome Biol* 5: R13.
- Sgaravatti, A. M., Rosa, R. B., Schuck, P. F., Ribeiro, C. A., Wannmacher, C. M., Wyse, A. T., Dutra-Filho, C. S., and Wajner, M. (2003). 'Inhibition of brain energy metabolism by the alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease'. *Biochim Biophys Acta* 1639: 232-238.

- Sharma, L. K., Fang, H., Liu, J., Vartak, R., Deng, J., and Bai, Y. (2011). 'Mitochondrial respiratory complex I dysfunction promotes tumorigenesis through ROS alteration and AKT activation'. *Hum Mol Genet* 20: 4605-4616.
- Sheinerman, K. S., Toledo, J. B., Tsivinsky, V. G., Irwin, D., Grossman, M., Weintraub, D., Hurtig, H. I., Chen-Plotkin, A., Wolk, D. A., McCluskey, L. F., Elman, L. B., Trojanowski, J. Q., and Umansky, S. R. (2017). 'Circulating brain-enriched microRNAs as novel biomarkers for detection and differentiation of neurodegenerative diseases'. *Alzheimers Res Ther* 9: 89.
- Sibley, C. R., Seow, Y., Saayman, S., Dijkstra, K. K., El Andaloussi, S., Weinberg, M. S., and Wood, M. J. (2012). 'The biogenesis and characterization of mammalian microRNAs of mirtron origin'. *Nucleic Acids Res* 40: 438-448.
- Smeitink, J., Sengers, R., Trijbels, F., and van den Heuvel, L. (2001). 'Human NADH:ubiquinone oxidoreductase'. *J Bioenerg Biomembr* 33: 259-266.
- Smith, R. A., Porteous, C. M., Gane, A. M., and Murphy, M. P. (2003). 'Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo'. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 5407-5412.
- Smoliga, J. M., and Blanchard, O. (2014). 'Enhancing the delivery of resveratrol in humans: if low bioavailability is the problem, what is the solution?'. *Molecules* 19: 17154-17172.
- Snow, B. J., Rolfe, F. L., Lockhart, M. M., Frampton, C. M., O'Sullivan, J. D., Fung, V., Smith, R. A., Murphy, M. P., Taylor, K. M., and Protect Study, Group (2010). 'A double-blind, placebo-controlled study to assess the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ as a disease-modifying therapy in Parkinson's disease'. *Mov Disord* 25: 1670-1674.
- Stauch, K. L., Villeneuve, L. M., Purnell, P. R., Ottemann, B. M., Emanuel, K., and Fox, H. S. (2016). 'Loss of Pink1 modulates synaptic mitochondrial bioenergetics in the rat striatum prior to motor symptoms: concomitant complex I respiratory defects and increased complex II-mediated respiration'. *Proteomics Clin Appl* 10: 1205-1217.
- Su, W., Aloï, M. S., and Garden, G. A. (2016). 'MicroRNAs mediating CNS inflammation: Small regulators with powerful potential'. *Brain Behav Immun* 52: 1-8.
- Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., and Yu, Q. (2015). 'MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis'. *Oncotarget* 6: 8474-8490.
- Sung, M. M., Das, S. K., Levasseur, J., Byrne, N. J., Fung, D., Kim, T. T., Masson, G., Boisvenue, J., Soltys, C. L., Oudit, G. Y., and Dyck, J. R. (2015). 'Resveratrol treatment of mice with pressure-overload-induced heart failure improves diastolic function and cardiac energy metabolism'. *Circ Heart Fail* 8: 128-137.
- Suormala, T., Wick, H., Bonjour, J. P., and Baumgartner, E. R. (1985). 'Rapid differential diagnosis of carboxylase deficiencies and evaluation for biotin-responsiveness in a single blood sample'. *Clin Chim Acta* 145: 151-162.
- Suzuki, Y. J., Carini, M., and Butterfield, D. A. (2010). 'Protein carbonylation'. *Antioxid Redox Signal* 12: 323-325.

- Tan, C. L., Plotkin, J. L., Veno, M. T., von Schimmelmann, M., Feinberg, P., Mann, S., Handler, A., Kjems, J., Surmeier, D. J., O'Carroll, D., Greengard, P., and Schaefer, A. (2013). 'MicroRNA-128 governs neuronal excitability and motor behavior in mice'. *Science* 342: 1254-1258.
- Tham, Y. K., Bernardo, B. C., Ooi, J. Y., Weeks, K. L., and McMullen, J. R. (2015). 'Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets'. *Arch Toxicol* 89: 1401-1438.
- Thompson, H. J., Heimendinger, J., Haegele, A., Sedlacek, S. M., Gillette, C., O'Neill, C., Wolfe, P., and Conry, C. (1999). 'Effect of increased vegetable and fruit consumption on markers of oxidative cellular damage'. *Carcinogenesis* 20: 2261-2266.
- Thomson, D. W., and Dinger, M. E. (2016). 'Endogenous microRNA sponges: evidence and controversy'. *Nat Rev Genet* 17: 272-283.
- Thusberg, J., Olatubosun, A., and Vihinen, M. (2011). 'Performance of mutation pathogenicity prediction methods on missense variants'. *Hum Mutat* 32: 358-368.
- Tonge, D. P., and Gant, T. W. (2016). 'What is normal? Next generation sequencing-driven analysis of the human circulating miRNAome'. *BMC Mol Biol* 17: 4.
- Toro, R., Blasco-Turrion, S., Morales-Ponce, F. J., Gonzalez, P., Martinez-Camblor, P., Lopez-Granados, A., Brugada, R., Campuzano, O., Perez-Serra, A., Rosa Longobardo, F., Mangas, A., Llorente-Cortes, V., and de Gonzalo-Calvo, D. (2018). 'Plasma microRNAs as biomarkers for Lamin A/C-related dilated cardiomyopathy'. *J Mol Med (Berl)*.
- Tummolo, A., Melpignano, L., Carella, A., Di Mauro, A. M., Piccinno, E., Vendemiale, M., Ortolani, F., Fedele, S., Masciopinto, M., and Papadia, F. (2018). 'Long-term continuous N-carbamylglutamate treatment in frequently decompensated propionic acidemia: a case report'. *J Med Case Rep* 12: 103.
- Turchinovich, A., Weiz, L., and Burwinkel, B. (2012). 'Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function'. *Trends Biochem Sci* 37: 460-465.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A. J., Mohamed, H., Wikstrom, J. D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S. E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B. F., Yuan, J., Deeney, J. T., Corkey, B. E., and Shirihai, O. S. (2008). 'Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy'. *EMBO J* 27: 433-446.
- Ugarte, M., Perez-Cerda, C., Rodriguez-Pombo, P., Desviat, L. R., Perez, B., Richard, E., Muro, S., Campeau, E., Ohura, T., and Gravel, R. A. (1999). 'Overview of mutations in the PCCA and PCCB genes causing propionic acidemia'. *Hum Mutat* 14: 275-282.
- Vallelunga, A., Ragusa, M., Di Mauro, S., Iannitti, T., Pilleri, M., Biundo, R., Weis, L., Di Pietro, C., De Iuliis, A., Nicoletti, A., Zappia, M., Purrello, M., and Antonini, A. (2014). 'Identification of circulating microRNAs for the differential diagnosis of Parkinson's disease and Multiple System Atrophy'. *Front Cell Neurosci* 8: 156.
- van Rooij, E., and Kauppinen, S. (2014). 'Development of microRNA therapeutics is coming of age'. *EMBO Mol Med* 6: 851-864.

- Varga, Z. V., Kupai, K., Szucs, G., Gaspar, R., Paloczi, J., Farago, N., Zvara, A., Puskas, L. G., Razga, Z., Tiszlavicz, L., Bencsik, P., Gorbe, A., Csonka, C., Ferdinandy, P., and Csont, T. (2013). 'MicroRNA-25-dependent up-regulation of NADPH oxidase 4 (NOX4) mediates hypercholesterolemia-induced oxidative/nitrative stress and subsequent dysfunction in the heart'. *J Mol Cell Cardiol* 62: 111-121.
- W**ang, H., Ye, Y., Zhu, Z., Mo, L., Lin, C., Wang, Q., Wang, H., Gong, X., He, X., Lu, G., Lu, F., and Zhang, S. (2016a). 'MiR-124 Regulates Apoptosis and Autophagy Process in MPTP Model of Parkinson's Disease by Targeting to Bim'. *Brain Pathol* 26: 167-176.
- Wang, J., Liew, O. W., Richards, A. M., and Chen, Y. T. (2016b). 'Overview of MicroRNAs in Cardiac Hypertrophy, Fibrosis, and Apoptosis'. *Int J Mol Sci* 17.
- Wang, X., Liu, P., Zhu, H., Xu, Y., Ma, C., Dai, X., Huang, L., Liu, Y., Zhang, L., and Qin, C. (2009). 'miR-34a, a microRNA up-regulated in a double transgenic mouse model of Alzheimer's disease, inhibits bcl2 translation'. *Brain Res Bull* 80: 268-273.
- Willers, I. M., Martinez-Reyes, I., Martinez-Diez, M., and Cuezva, J. M. (2012). 'miR-127-5p targets the 3'UTR of human beta-F1-ATPase mRNA and inhibits its translation'. *Biochim Biophys Acta* 1817: 838-848.
- Wilnai, Y., Enns, G. M., Niemi, A. K., Higgins, J., and Vogel, H. (2014). 'Abnormal hepatocellular mitochondria in methylmalonic acidemia'. *Ultrastruct Pathol* 38: 309-314.
- Wongkittichote, P., Ah Mew, N., and Chapman, K. A. (2017). 'Propionyl-CoA carboxylase - A review'. *Mol Genet Metab* 122: 145-152.
- Wos, M., Szczepanowska, J., Pikula, S., Tytki-Szymanska, A., Zablocki, K., and Bandorowicz-Pikula, J. (2016). 'Mitochondrial dysfunction in fibroblasts derived from patients with Niemann-Pick type C disease'. *Arch Biochem Biophys* 593: 50-59.
- X**u, Y., Chen, P., Wang, X., Yao, J., and Zhuang, S. (2018). 'miR-34a deficiency in APP/PS1 mice promotes cognitive function by increasing synaptic plasticity via AMPA and NMDA receptors'. *Neurosci Lett* 670: 94-104.
- Y**amakuchi, M. (2012). 'MicroRNA Regulation of SIRT1'. *Front Physiol* 3: 68.
- Yang, H., Jin, X., Kei Lam, C. W., and Yan, S. K. (2011). 'Oxidative stress and diabetes mellitus'. *Clin Chem Lab Med* 49: 1773-1782.
- Yang, K. C., Bonini, M. G., and Dudley, S. C., Jr. (2014). 'Mitochondria and arrhythmias'. *Free Radic Biol Med* 71: 351-361.
- Yano, S., Li, L., Le, T. P., Moseley, K., Guedalia, A., Lee, J., Gonzalez, I., and Boles, R. G. (2003). 'Infantile mitochondrial DNA depletion syndrome associated with methylmalonic aciduria and 3-methylcrotonyl-CoA and propionyl-CoA carboxylase deficiencies in two unrelated patients: a new phenotype of mtDNA depletion syndrome'. *J Inherit Metab Dis* 26: 481-488.

- Yin, X., Manczak, M., and Reddy, P. H. (2016).
'Mitochondria-targeted molecules MitoQ
and SS31 reduce mutant huntingtin-
induced mitochondrial toxicity and
synaptic damage in Huntington's disease'.
Hum Mol Genet 25: 1739-1753.

Parte de este trabajo ha sido recogido en las siguientes publicaciones:

Rivera-Barahona, A., Navarrete, R., Garcia-Rodriguez, R., Richard, E., Ugarte, M., Perez-Cerda, C., Perez, B., Gamez, A., and Desviat, L. R. (2018). 'Identification of 34 novel mutations in propionic acidemia: Functional characterization of missense variants and phenotype associations'. *Mol Genet Metab* 125: 266-275.

Richard, E., Gallego-Villar, L., **Rivera-Barahona, A.**, Oyarzabal, A., Perez, B., Rodriguez-Pombo, P., and Desviat, L. R. (2018). 'Altered Redox Homeostasis in Branched-Chain Amino Acid Disorders, Organic Acidurias, and Homocystinuria'. *Oxid Med Cell Longev* 2018: 1246069.

Rivera-Barahona, A., Fulgencio-Covian, A., Perez-Cerda, C., Ramos, R., Barry, M. A., Ugarte, M., Perez, B., Richard, E., and Desviat, L. R. (2017). 'Dysregulated miRNAs and their pathogenic implications for the neurometabolic disease propionic acidemia'. *Sci Rep* 7: 5727.

Rivera-Barahona, A., Perez, B., Richard, E., and Desviat, L. R. (2017). 'Role of miRNAs in human disease and inborn errors of metabolism'. *J Inherit Metab Dis*.

Rivera-Barahona, A., Alonso-Barroso, E., Perez, B., Murphy, M. P., Richard, E., and Desviat, L. R. (2017). 'Treatment with antioxidants ameliorates oxidative damage in a mouse model of propionic acidemia'. *Mol Genet Metab* 122: 43-50.

Gallego-Villar, L., **Rivera-Barahona, A.**, Cuevas-Martin, C., Guenzel, A., Perez, B., Barry, M. A., Murphy, M. P., Logan, A., Gonzalez-Quintana, A., Martin, M. A., Medina, S., Gil-Izquierdo, A., Cuezva, J. M., Richard, E., and Desviat, L. R. (2016). 'In vivo evidence of mitochondrial dysfunction and altered redox homeostasis in a genetic mouse model of propionic acidemia: Implications for the pathophysiology of this disorder'. *Free Radic Biol Med* 96: 1-12.